MEMORIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo XXVIII Fevereiro--1934 Fasciculo 1

Estudos sobre o Schizotrypanum cruzi (*)

pelo

DR. EMMANUEL DIAS

(Com as estampas I — XII)

INDICE

I) Introdução 1
II) *S. cruzi* no organismo do Vertebrado 3
III) *S. cruzi* no organismo do Invertebrado 33
IV) Transmissão do Inséto ao Vertebrado 73
V) Cultura in vitro e na cavidade geral do *T. megista* .. 81
VI) Pesquizas in natura 90
VII) Bibliografia 98
VIII) Explicação das estampas 107

INTRODUÇÃO

A descoberta do *Schizotrypanum cruzi* por Carlos Chagas trouxe novo campo de pesquizas no dominio da Biologia e da Medicina Tropical. Pelos trabalhos de Chagas adquiriu a Ciencia os conhecimentos fundamentais sobre uma nova doença humana: o agente etiologico e sua transmissão por Hemipteros hematófagos; os reservatórios de virus na natureza; sua atividade patogenica para os animais de laboratorio, traduzindo-se no homem por quadros clinicos complexos, — tais foram em

(*) Tése de doutoramento, apresentada á Faculdade de Medicina da Universidade do Rio de Janeiro. Defendida em 21 de Dezembro de 1933 e aprovada com distinção.

grandes linhas os conhecimentos com que enriqueceu a Ciencia um unico pesquizador.

Outros autores estudaram a biologia do *Schizotrypanum cruzi* e os processos patogenicos da «Doença de Chagas», contribuindo poderosamente para a solução de certos problemas: E. Brumpt, Gaspar Vianna, Mayer e Rocha Lima, Eurico Villela, Arthur Neiva, Magarinos Torres e Souza Campos foram os que mais concorreram para ampliar a grande obra de Chagas.

Nossos estudos sobre o agente etiologico da triponosomiase americana foram iniciados nas ultimas semanas de 1929, quando trabalhavamos com o Dr. José Gomes de Faria no Laboratorio do Hospital Arthur Bernardes, em material que nos foi bondosamente cedido pelo Professor Chagas.

Em 1930 continuámos nossos trabalhos, já então no Instituto Oswaldo Cruz diretamente orientado por este pesquizador, onde e com quem temos trabalhado até agora. Melhores condições não poderiamos ter encontrado para a realização de semelhantes estudos, e deles muito mais seria de esperar, não fossem tambem imprescindiveis ao trabalho experimental qualidades pessoais que só se adquirem em longos anos de lida continua no laboratório.

Reunimos neste publicação, que apresentámos como Tése de Doutoramento á Faculdade de Medicina da Universidade do Rio de Janeiro, os principais dados que pudemos adquirir no estudo do tripanosoma de Chagas, alguns dos quais já se acham referidos em publicações anteriores. Para ter podido satisfazer aos requisitos de uma Tése, o presente trabalho representa apenas uma série de resultados experimentais e de observação por nós obtidos; não é um trabalho de conjunto, em que estudamos metódicamente a Tripanosomiase americana, desde a biologia do agente patogenico e dos insétos transmissores até as expressões clinicas e a terapeutica da doença humana. Seus capitulos concernem a aspétos da biologia do *S. cruzi* que foram por nós mais detalhadamente estudados, sucedendo-se em ordem mais ou menos arbitraria sem haver entre eles, necessariamente, estreita correlação.

Nestes «Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*» consideraremos em primeiro logar as relações do parasito com o hospedador Vertebrado, em condições experimentais; em seguida, sua evolução em Invertebrados, transmissores naturais ou não; os métodos de transmissão da doença; o cultivo artificial do flagelado *in vitro* e na cavidade geral do *Triatoma megista*. Por fim, relataremos algumas observações e experiencias feitas no primeiro fóco conhecido da enfermidade e anexaremos uma con-

tribuição ao estudo de um flagelado do mesmo genero, parasito de morcêgos, muito semelhante ao *S. cruzi*.

Os assuntos de que tratamos acham-se expostos segundo a ordem iniciada no index geral e no sumário que se ségue ao titulo de cada capitulo. Naturalmente, o titulo de cada capitulo ou seção não importa no estudo desenvolvido da materia correspondente, compreendendo uns, a respeito, mesmo, apenas ligeiras referencias. Damos, quando possivel, os principais resultados de pesquizas anteriores, focalizando aspectos de cada problema, e relatando experiencias nossas que possam contribuir para sua elucidação. Estas experiencias são em geral, pouco numerosas; mas, não poderiamos estudar a fundo todos os interessantissimos fátos que se apresentam na biologia do *S. cruzi*: muitos ficam ainda na obscuridade, reclamando novas pesquizas.

Ao Professor Chagas devemos a realização de nossos trabalhos. Além do auxilio imprecindivel de sua orientação cientifica e dos beneficios de um estimulo constante, encontrámos no seu laboratorio todo o material necessario á experimentação.

Durante nossos estudos tivemos tambem o recurso inestimavel do contrôle seguro e dos bons ensinamentos do dr. Eurico Villela.

Ao Professor Chagas e ao Dr. Villela exprimimos a nossa maior gratidão pelo muito que lucrámos de sua sabedoria e de seu altruismo.

Ao Dr. Gomes de Faria, nosso primeiro mestre, manifestamos nosso sincero reconhecimento pela longa iniciação técnica que lhe devemos.

Após a apresentação da tése á Faculdade de Medicina, foram feitos ligeiros retoques em diversos pontos deste trabalho, e acrecentados os resultados de algumas experiencias não publicadas, além de nóvas referencias bibliográficas.

II) — **Schizotrypanum cruzi no organismo do Vertebrado:**

Sumário: — A) — Evolução inicial da infecção experimental: distribuição dos parasitos no organismo; inoculação de fórmas sanguicolas: passagem para o sangue, duração da fase sanguinea inicial, periodo de incubação, infectividade dos parasitos durante a fase sanguinea inicial, morfología no sangue e nos tecidos; inoculação de tripanosomas metacíclicos; distribuição segundo a vía de inoculação.

B) — Marcha geral da infecção: sensibilidade de animais; virulencia, raças de *S. cruzi*, genealogia; *S. cruzi* no sangue e nos tecidos; Sistema reticulo-endotelial: adaptação e afinidade pelo SRE, mecanismo de penetração nas celulas; papel de defeza do SRE, bloqueios e esplenectomias.

C) — Imunidade adquirida: desaparecimento dos parasitos do sangue; reinoculações, recidivas; ação protetôra do sôro de animais imunes; anticórpos. Imunidade natural: animais de sangue frío e de sangue quente.

EVOLUÇÃO INICIAL DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Trataremos em primeiro logar da distribuição inicial dos parasitos durante as primeiras fáses da infecção, acompanhando as modificações morfologicas do *S. cruzi* e suas relações com o organismo parasitado, desde o momento da inoculação. Sobre este assunto publicámos anteriormente uma nóta prévia (1932) em que nossas conclusões foram parcialmente expostas.

Segundo o material inoculado provenha de animaes infectados ou de triatomas parasitados, é variavel a distribuição inicial dos tripanosomas no animial injetado; consideraremos primeiramente o que se passa logo após a inoculação de sangue infectado, por diversas vias.

Passagem para o sangue — E. Villela, trabalhando com coelhos novos, em experiencias não publicadas, observou que em pouco tempo os parasitos inoculados podiam ser encontrados no sangue periferico. E. Brumpt (1912) faz referencia á passagem de fórmas largas do tripanosoma para a torrente circulatoria « em algumas horas ». A rapida passagem para o sangue pode ser facilmente verificada em animais de pequeno tamanho, principalmente quando é grande o numero de parasitos inoculados. — Injetando pequenos cães e examinando seu sangue com curtos intervalos, observámos que aí podiam se encontrar tripanosomas 40 minutos após a inoculação subcutanea (cão de 795 gr.) e 165 minutos após a inoculação intraperitonial (cão de 720 gr.). C. Chagas Filho em experiencia inédita verificou tambem a rapida passagem para o sangue em gatinhos inoculados na massa encefalica.

Os tripanosomas que se encontram na circulação desde as primeiras horas, com a morfologia das fórmas finas ou das fórmas largas, pódem aí permanecer por varios dias, não migrando para os tecidos e não se dividindo no sangue: constituem uma fáse da infecção a que propuzemos chamar-se « fáse sanguinea inicial ».

Duração da fáse sanguinea inicial; periodo de incubação.

Inoculando-se sangue rico em tripanosomas em animal novo, alguns deles, como dissemos, passam em pouco tempo para a torrente circulatoria, onde podem ser encontrados pelo exame a fresco nos dias subsequentes, sempre em pequeno numero mais ou menos constante. Geralmente no 5.º dia depois da inoculação nota-se um acrécimo sensivel

no numero de flagelados no sangue periferico; é então que começa a verdadeira fáse sanguinea da infecção, caracterizada pelo aumento crecente do numero de parasitos, pela chegada daqueles resultantes da multiplicação intracelular. Pelo fáto que acabamos de expôr, não se póde avaliar a duração do periodo de incubação nas infecções obtidas por inoculação de sangue contaminado pelo simples aparecimento de tripanosomas no sangue circulante do animal inoculado; achamos que se deve considerar como marcando o fim do periodo de incubação o apparecimento na circulação dos tripanosomas recemformados nos tecidos, que determina um aumento numerico sensivel dos parasitos no sangue.

Nos diversos animais inoculados com sangue muito infectado o periodo de incubação, avaliado segundo este criterio, foi em geral de 5 dias. Não se deve esquecer de que estas verificações não têm significação pratica senão no caso de pequenos animais inoculados com sangue rico em parasitos; experimentando-se com animaes de grande peso é sempre dificil a determinação de tripanosomas pelo exame diréto do sangue nos primeiros dias, a menos que se tenha injetado grande numero de parasitos. O periodo de incubação está sujeito naturalmente a variações segundo a resistencia do animal e a virulencia e o numero de parasitos inoculados; sua duração para cada animal tem sido avaliada dentro de limites bastantes amplos por diversos autores, sendo a existencia da fáse sanguinea inicial uma das causas capazes de falsear a sua avaliação. Quando se inocula pequeno numero de parasitos não se observa a fáse sanguinea inicial, ou porque não exista realmente, ou, o que é mais admissivel, porque escape á observação.

M. Torres (1922) verificou a presença precoce do *S. cruzi* na circulação semeando sangue de cobaia dois dias depois de inoculada.

Ignora-se quanto tempo os tripanosomas inoculados que passaram rapidamente para a circulação aí possam permanecer sem migrarem para os tecidos ou sem serem destruidos; já vimos que aí se encontram até começar a invasão do sangue pelas fórmas vindas dos tecidos, isto é, desde o primeiro ao quinto dia depois da inoculação. A permanencia de flagelados no sangue periferico durante o « periodo de incubação » póde ser attribuida seja á sua capacidade definitiva de migrar para os tecidos, seja á sua incapacidade provisoria. Para verificar a infectividade dos tripanosomas sanguicolas durante a fáse sanguinea inicial fizemos as seguintes experiencias:

1)—Foi inoculado intraperitonialmente em 17-II-33 um camondongo branco com 2 c. c. de sangue de cobaia infectada. Diariamente, até o dia 21 do mesmo mez, retiravam-se deste camondongo, por secção da extremidade

da cauda, 5-6 gotas de sangue que eram recebidas em sôro fisiologico citratado e inoculadas em outros camondongos, depois de verificada a presença de tripanosomas. O seguinte quadro resume os resultados obtidos:

QUADRO 1

Camondongo nº.	Data da inoculação	Resultados														
		22	27	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	13	16
1	18—II—33	†														
2	19—II—33	.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	20—II—33	.	—	—	—	—	—	—	—	+						
4	21—II—33	.	.	.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+

† morte
— + exame de sangue negativo e positivo
. não examinado

Em vista dos resultados das inoculações dos dois primeiros dias, repetimos a experiencia nas seguintes condições:

2)—Em 8-V-33 foi inoculado um camondongo no peritonio e sob a pele do dorso com 2 c. c. de sangue de um cão no 21º dia de infecção (raça de tatú, 1a. passagem). 24 e 48 horas depois de inoculado foram retiradas 5 gotas de sangue da extremidade da cauda deste camondongo e injetadas em mistura com sôro citratado em dois camondongos. Ambos se infectaram, tendo tido exames de sangue positivos 8 dias depois de inoculados.

— Por estas experiencias verificámos que durante toda a fáse sanguinea inicial ha parasitos na circulação infectantes, isto é, capazes de se localizarem no interior de elementos anatomicos e aí se multiplicarem.

— Morfología dos parasitos no sangue e nos tecidos durante os primeiros dias.—No sangue de gatinhos recemnascidos encontrámos 24 horas depois da inoculação tripanosomas de protoplasma irregularmente corado e com pequenas granulações de volutina. Estas alterações morfologicas, provavelmente degenerativas, não são constantes. No cão, nos primeiros dias, muitos tripanosomas têm a morfologia da chamada «fórma fina». Nos tecidos, os diferentes estadios evolutivos intracelulares sucedem-se como na cultura ou no intestino do inséto (Chagas). Os parasitos multiplicam-se sob a fórma de leishmania e passando pela fórma de *critídia*, transformam-se em tripanosomas. A fáse intermediaria de *critídia* tem curta

duração; durante a mesma os flagelados ainda pódem se dividir. As leishmanias reproduzem-se por divisões binarias simples e excepcionalmente por divisões multiplas. Em frottis de orgãos de animais sacrificados durante a fase inicial de multiplicação encontrámos raras vezes massas protoplasmaticas encerrando dois ou mais grupamentos de nucleo-blefaroplasto.

O ciclo intracelular completo, de tripanosoma a tripanosoma, dura em geral 5 dias durante as primeiras fáses da infecção aguda. Dentro do mesmo elemento celular os parasitos estão no mesmo estadio evolutivo (Mayer e Rocha Lima, 1912).

Inoculação de tripanosomas metaciclicos — Quando se inoculam pequenos animais com certas dejeções de triatomas, muito ricas em tripanosomas metaciclicos, não se verifica o aparecimento de parasitos na circulação senão depois de decorrido um certo numero de dias, variavel de 8 a 11 em média. Confirmamos as observações de Brumpt (1927) segundo as quais, nos animais inoculados com fórmas metaciclicas do inséto, os tripanosomas não aparecem no sangue pouco depois, ao contrario do que acontece com aqueles inoculados com as fórmas sanguicolas do *S. cruzi*. Nos animais injétados com dejeções ou conteúdo intestinal de barbeiros infectados o aparecimento dos primeiros parasitos na circulação assinála o fim do periodo de incubação. A inexistencia de uma fáse sanguinea inicial nos animais assim infectados é explicavel pela grande afinidade que os tripanosomas metaciclicos têm por certos elementos dos tecidos e pela sua grande capacidade de penetração. A permanencia destas fórmas no sangue será muito rapida, não tendo sido por nós ainda verificada. Lafont (1912), inoculando conteúdo intestinal de *Triatoma rubrofasciata* muito rico em tripanosomas, no peritonio de camondongos, observou o aparecimento de parasitos no sangue 6, 30, 48 horas, 3 e 7 dias depois da inoculação. Em camondongos brancos inoculados com *S. cruzi* proveniente de *Triatoma megista*, Brumpt e P. da Silva (1912) verificaram um periodo de incubação de 5 dias.

—Distribuição inicial dos parasitos nos tecidos segundo a via de inoculação.—De um modo geral, qualquer que seja a via de inoculação, quando se injéta em animal novo sangue de um animal infectado, sempre se observa a passagem mais ou menos rapida de alguns tripanosomas para o sangue do primeiro; a maioria porém ganha os tecidos, quér dirétamente, quér por veículação pelo sangue. A localização nos tecidos é mais rapida e quasi sempre diréta quando se inoculam fórmas metaciclicas do *S. cruzi*.

Via subcutanea.—Os parasitos localizam-se principalmente no interior de elementos do ponto de inoculação e vizinhanças, onde se multiplicam intensamente. No caso de inoculação de fórmas sanguicolas, dos tripanosomas que passam para a circulação alguns se localizam em diversos or-

gãos, emquanto que outros permanecem no sangue determinando a fáse sanguinea inicial. As seguintes observações mostram a importancia do ponto de inoculação como fóco de proliferação inicial:

Cão de 795 gr. inoculado sob a péle com sangue de cão bastante infectado (*S. cruzi,* raça humana, 21º dia de infecção). Exames de sangue feitos diariamente, positivos desde 40 minutos após a inoculação; a infecção sanguinea aumentou no 5.º dia, quando foi sacrificado.

Nos frottis de varios orgãos encontravam-se fórmas sanguicolas, e leishmanias sempre em pequeno numero; baço-raras leishmanias isoladas ou raramente em pequenos grupos de 4-6. Figado-fórmas sanguicolas e muito raras leishmanias. Ganglio periferico-leishmanias mais frequentes embora em pequeno numero; tripanosomas e fórmas de evolução intermediarias (critídias). Musculo do ponto de inoculação—numerosas fórmas de evolução, tripanosomas finos. Liquido de edema do ponto de inoculação — rico em fórmas flageladas e de evolução. Liquido peritonial — a fresco e corado, após centrifugação, raros tripanosomas. Medula ossea — femur-raras leishmanias. Sangue-tripanosomas normaes (fórmas finas) não muito numerosos. Exame dos córtes.-Ponto de inoculação e adjacencias-(musculo da coxa e tecido sub-cutaneo)-grande numero de celulas repletas de leishmanias, bem como uma fibra muscular estriada; em alguns córtes as cellulas peri-musculares são raramente parasitadas ao passo que grande numero de celulas do tecido conjunctivo frouxo contém leishmanias, (Estampa 1, fig. 2); em outros as celulas peri-musculares estão tambem intensamente parasitadas. Ganglio, raras celulas do reticulo bem parasitadas. Nos córtes de baço, figado, coração, pulmão, cerebro e cerebello não encontrámos elementos parasitados.

Camondongo adulto inoculado com sangue infectado em 1-XI-32, subcutanea e intraperitonealmente; exames de sangue positivos nos dias 4, 5, 6 (fórmas finas), 7, sacrificado a 9 do mesmo mez. Frottis: ponto subcutaneo inoculado-leishmanias e tripanosomas. Peritonio (raspagem)-muito raras leishmanias. Baço, negativo; figado-tripanosomas sanguicolas. Córtes: Ponto de inoculação-numerosas celulas parasitadas no tecido conjuntivo subcutaneo e entre os feixes musculares; não encontrámos leishmanias no interior de fibras musculares. Não achamos celulas parasitadas nos córtes de baço, testiculo e cerebro.

Camondongo adulto inoculado sob a péle em 1-XI-32 com dejeções limpidas muito infectadas de *T. megista.* Exames negativos de sangue 5, 6, 7, positivo 8-XI-32; sacrificado no dia 9. Frottis: Ponto de inoculação — raras leishmanias. Baço, figado e testiculo, negativos. Córtes: Ponto de inoculação — celulas relativamente pouco numerosas repletas de parasitos (leishmanias ou tripanosomas); celulas de parede de vaso parasitadas. Entre os feixes musculares e no tecido sub-cutaneo nota-se um exsudato rico em monocitos e polimorfonucleares; não vimos leishmanias dentro de fibras musculares. Nos córtes de coração, baço, cerebro, testiculo, pulmão e intestino delgado, não encontrámos parasitos.

Cão de 1200 gr., macho, inoculado (13-X-32) em varios pontos do tecido sub-cutaneo (sob os mamílos) com dejeções limpidas de *T. megista* muito ricas em tripanosomas metaciclicos: Exames de sangue negativos em 14, 15, 17, 18, positivo em 24-X-32 (tripanosomas relativamente numerosos). Retirámos e incluimos pequenos fragmentos de tecido dos pontos inoculados 5, 11 e 16 dias depois da inoculação, em cujos córtes encontrámos celulas parasitadas cada vez mais numerosas quanto maior o tempo decorrido desde a inoculação. Nos pontos em que eram feitas as biópsias formavam-se ulceras que não cicatrizavam, nos esfregaços e córtes das quaes encontrámos leishmanias. O animal morreu em 4-XI-32 com intensa infecção sanguinea. Nos orgãos havia numerosos parasitos: Coração (miocardite), baço, figado, ganglio periferico, supra-renal, testiculo, pulmão, musculos estriados, ulceração do ponto de inoculação retirado no 11º dia. Nos frottis de medula ossea encontrámos leishmanias.

—Via intraperitoneal.—Os parasitos inoculados desaparecem pouco a pouco da cavidade, passando para o sangue e para os tecidos, não se encontrando mais fórmas livres depois de 24 horas (cão); mais tarde podem-se encontrar aí tripanosomas, provenientes da multiplicação nos tecidos. Nota-se desde as primeiras horas o aparecimento no liquido peritonial de elementos celulares emigrados do sangue, aos quais frequentemente adérem triypanosomas; a fagocitose entretanto é um fáto excepcional (cão, 6 horas).

Nos animaes inoculados com *S. cruzi* por outras vias menos correntemente empregadas, como a intra-raquiana e a intra-ocular, observa-se igualmente a penetração e multiplicação de parasitos em elementos das regiões injétadas, como se vê pelas seguintes experiencias:

Cão de 1200 gr., inoculado em 16-XI-32 com pequena quantidade de urina hialina de triatoma infectado, diluida em agua fisiologica. A inoculação, realizada por punção sub-occipital, foi feita pelo Dr. E. Vilela. O sangue foi examinado com resultado negativo nos dias 21 e 22; em 24-XI-32 foram encontrados raros tripanosomas (fórmas finas em menor numero do que os existentes no liquor retirado neste mesmo dia por punção sub-occipital. No dia seguinte o cão apresentava convulsões e sináes de paralisia, tendo sido então sacrificado. Nos córtes de bulbo e medula espinhal encontrámos fócos parasitarios esparsos, que não foram vistos no cerebro. Outros orgãos não foram examinados.

Gatinho inoculado pelo Dr. E. Villela em 9-IV-32, na camara anterior do olho, com sangue (citratado e centrifugado) de um cão morto no 22º dia de infecção pelo *S. cruzi*, raça humana. O animal morreu 13 dias depois de inoculado, tendo tido exame de sangue negativo no 4º dia e positivo no 11.º dia. No humor aquoso do olho inoculado havia tripanosomas relativamente abundantes, quando morreu; no humor vitreo não achámos parasitos. Nos córtes do olho viam-se numerosos elementos do tecido conjuntivo, córnea e iris parasitados. 2 ou 3 dias depois da inoculação a córnea se apresentava opacificada.

Quanto á via de inoculação sanguinea não ha nada de particular a ser assignalado. A maioria dos parasitos se localiza em diversos orgãos, emquanto que alguns permanecem na circulação ocasionando a fáse sanguinea inicial, no caso da inoculação de tripanosomas sanguicolas.

Pelas experiencias que acima referimos vê-se que, de uma maneira geral, qualquer que seja a via de inoculação utilizada, tanto as fórmas sanguicolas como as fórmas metaciclicas do *S. cruzi* têm histotropismo muito acentuado, principalmente estas. Penetrando em elementos celulares dos pontos de inoculação e multiplicando-se ativamente, aí constituem a principal séde de sua proliferação inicial.

MARCHA GERAL DA INFECÇÃO

Os tripanosomas resultantes da multiplacição intracelular cáem na circulação e se espalham por todo o organismo, localizando-se em elementos celulares dos diversos orgãos, onde novamente se multiplicam. A infecção póde evoluir agudamente, pelo aumento crecente e rapido do numero de parasitos nos tecidos e no sangue, terminando pela morte do animal, ou tornar-se crônica após uma fáse sanguinea mais ou ou menos intensa e de duração variavel.

Quanto á presença de parasitos no sangue periferico ha nitida diferença entre as infecções humanas e as dos animais de laboratorio. Ao passo que naquelas os tripanosomas só pódem ser encontrados pelo exame directo do sangue, e geralmente em pequeno numero, durante os primeiros dias de molestia, nestas, ao contrario, pódem ser facilmente encontrados pela mesma maneira durante longo tempo (Chagas).

O gráu de infecção bem como a persistencia de parasitos na circulação de animaes experimentalmente infectados é muito variavel para cada especie de animal sensivel e mesmo para individuos da mesma especie, ainda quando inoculados com material infectante de egual procedencia.

Os dados mais minuciosos a este respeito, actualmente existentes, são referidos por H. C. Clark e L. H. Dunn (1932), que acompanharam cuidadosamente a infecção em diversos animaes inoculados com *S. cruzi* de virulencia atenuada, de diferentes origens.

Os animais mais sensiveis á infecção, segundo Chagas, são os cãis e gatos jovens, cobaias e macacos do genero *Callithrix*. Nas nossas experiencias temos nos utilizado principalmente de cãis, nos quais a infecção é em geral mais intensa que nas cobaias. Os camondongos brancos tambem se prestam muito á experimentação com o *S. cruzi*. Os animaes jovens são mais sensiveis á infecção (Chagas).

Tanto nos casos cronicos da tripanosomiase americana, como nos animaes que já não têm infecção sanguinea apreciavel, os parasitos pódem por muito tempo conservar-se nos tecidos sob a fórma de leishma-

nia, vivos e atívos; este fáto explica a presença ocasional de tripanosomas no sangue de enfermos cronicos, do qual pódem ser isolados por inoculação (Chagas), e os casos de recidivas algumas vezes observados em animaes (Mayer e R. Lima, Blanchard).

A marcha da infecção dos animaes de laboratorio é tambem muito variavel, naturalmente, segundo a virulencia do *S. cruzi*, que por sua vez varia conforme a origem do parasito. As amostras mais patogenicas de *Schizotrypanum* tem sido as isoladas em Lassance (Minas Gerais), onde este parasito é grandemente espalhado. Em outros paizes das Americas, em que foi encontrado, sua patogenicidade para o homem e para os animaes é em geral fraca.

A *raça* mais virulenta para animais de laboratorio é a proveniente do tatú, nos quaes produz intensas infecções que rapidamente terminam pela morte, principalmente em cãis jovens (Chagas).

Durante nossas estadías em Lassance tivemos ocasião de isolar varias amostras de *S. cruzi* de animais portadores de infecção natural, tatús, cãis e gatos. Os quadros 2, 3 e 4 das pags. 12 e 13, que representam a «genealogia» (Schilling) de duas raças de cão e uma de tatú, mostram a grande virulencia destas raças para o cão. As datas da morte dos animais que figuram nestes quadros nem sempre apresentam o termo natural da infecção; alguns eram sacrificados para experiencias ou sangrados no coração para passagens, mas sempre com grande numero de tripanosomas no sangue periferico.

Duas amostras que tivemos no laboratorio isoladas de gatos eram de virulencia muito menor. As infecções obtidas por inoculação de sangue humano são em regra pouco intensas; atualmente existem no laboratorio do Dr. Chagas duas raças isoladas de doentes trazidos de Lassance, ainda com poucas passagens, que continuaremos a estudar. As inoculações de dejeções ou conteúdo intestinal de *T. megista* parasitados determinam infecções de evolução muito variavel, em geral graves.

Qualquer que seja o material infectante utilizado, a intensidade da infecção depende muito do numero de parasitos inoculados. Por varias vezes temos conseguido fortes infecções fazendo inoculações subcutaneas em diversas regiões do mesmo animal, ou fazendo passagens do sangue de animaes pouco dias depois de começarem a augmentar os parasitos no sangue.

Passagens sucessivas de animal a animal pódem inicialmente aumentar a virulencia do tripanosoma, mas parece que em geral a virulencia decréce muito após grande numero de inoculações, como algumas vezes temos observado.

QUADROS 2 e 3

Amostras de *S. Cruzi* isoladas de cães com infecção natural em Lassance (Abril 1933)

Cão da cafúa de Geremias (2)

Passagem	Animal inoculado	Sangue injectado de	Data da inoculação	Data da mórte	Dias de infecção
1a.	Cobaia	Cão	17 – IV	20 – V	33
	«	«	« «	26 – V	39
	«	«	« «	5 – VIII	109
	Cão	«	« «	13 – V	26
	«	«	« «	« «	«
2a.	Cão	«	12 – V	8 – VI	26
	«	«	13 – V	27 – V	14
3a.	«	«	8 – VI	28 – VI	20
	«	«	« «	1 – VII	23
4a.	«	«	26 – VI	13 – VII	17
	«	«	« «	«	«
	«	«	1 – VII	2 – VIII	32
	«	«	« «	9 – VIII	39
5a.	«	«	13 – VII	24 – VII	11
	«	«	« «	25 – VII	12
	«	«	2 – VIII	12 – VIII	10
	«	«	« «	« «	«
6a.	«	«	12 – VIII	26 – VIII	14
7a.	«	«	26 – VIII	11 – IX	16
8a.	«	«	11 – IX	2 – X	21
	«	«	« «	3 – X	22
9a.	«	«	29 – IX	7 – X	8
10a.	«	«	5 – X	13 – X	8
	«	«	« «	6 – X	—
11a.	«	«	13 – X	14 – X	—
	«	«	« «	16 – X	—

Cão da cafúa de Argemiro (3)

Passagem	Animal inoculado	Sangue injectado de	Data da inoculação	Data da mórte	Dias de infecção
1a.	Cobaia	Cão	3 – IV	17 – IV	14
	«	«	« «	9 – IX	159
	Cão	«	7 – IV	28 – IV	21
2a.	Sagui	«	28 – IV	17 – V	19
	«	«	« «	19 – VI	52
3a.	Cão	Sagui	15 – V	7 – VI	23
4a.	«	Cão	31 – V	12 – VI	12
	«	«	« «	22 – VI	22
5a.	«	«	12 – VI	23 – VI	11
	«	«	« «	24 – VI	12
6a.	«	«	23 – VI	25 – VI	—
	«	«	« «	« «	—

QUADRO 4

Amostra de *S. Cruzi* isolada de tatú com infecção natural (Lassance, Abril 1933)

Passagem	Animal inoculado	Sangue injectado de	Data da inoculação	Data da mórte	Dias de infecção
1ª.	Cobaia	Tatú	17—IV	22—VIII	127
	Cão	«	« «	10—V	23
2ª.	«	Cão	8—V	27—V	19
	«	Cobaia	14—VI	22—VI	8 (?)
	«	«	23—VI	?	?
	«	«	« «	?	?
3ª.	«	Cão	27—V	6—VI	10
	«	«	« «	« «	«
	«	«	5 — VII	21—VII	16
	«	«	« «	?	?
4ª.	«	«	21—VII	29—VII	8
	«	«	« «	1—VIII	11
5ª.	«	«	29—VII	9—VIII	11
	«	«	« «	10—VIII	12
	Cobaia	«	1 — VIII	—	—
	«	«	« «	—	—
6ª.	Cão	«	10—VIII	23—VIII	13
	«	Cobaia	29—VIII	13—IX	15
7ª.	«	Cão	12—IX	19—IX	7
	«	«	« «	24 -IX	12
8ª.	«	«	21—IX	3—X	12
9ª.	«	«	27 - IX	5 - X	8
	«	«	« «	6 — X	9
10ª.	«	«	5—X	14—X	9
	«	«	« «	17—X	12
11ª.	«	«	17—X	26—X	—
	«	«	« «	—	—
12ª.	«	«	26—X		

— Estudaremos a seguir diversos aspétos do *S. cruzi* no sangue e nos tecidos dos animaes parasitados, depois de estabelecida a infecção.

S. cruzi no sangue: — Os parasitos se apresentam no sangue circulante muitas vezes sob dois aspétos morfologicos bem caracterizados (Chagas): flagelados delgados e longos, de nucleo alongado e movimentos muito ativos, ou largos, de plasma abundante, nucleo ovoide e movimentos de translação lentos.

Segundo Chagas o *S. cruzi* é dotado de diferenciação sexual, que se traduz nos tripanosomas adultos pelo seu dimorfismo, sendo as fórmas finas o elemento masculino (microgameto) e as fórmas largas o elemento feminino (macrogameto).

Outros autores interpretam diversamente a variabilidade morfológica das fórmas sanguicolas dos tripanosomas. Breinl e Moore atri-

buem-n'a a estados de crecimento dos parasitos, considerando as fórmas finas as mais jovens. No caso do *S. cruzi* esta interpretação é aceita por Brumpt, Mayer e Rocha Lima, Magarinos Torres, etc. O fáto de aparecerem primeiro as fórmas finas no sangue periferico dos animais inoculados, e a existencia de fórmas intermediarias entre os dois tipos extremos de flagelados, constituem os principais fundamentos desta interpretação, aliás já entrevista por Chagas (1909) conforme o assinalou Torres (1918). Este autor propõe, em seu trabalho, as designações de formas jovens e formas adultas do *S. cruzi* em substituição ás correntemente usadas de fórmas finas (fórmas delgadas, organismo filiforme) e formas largas.

Em nossas experiencias temos comumente observado o apparecimento das formas jovens na circulação antes das formas adultas, nas infecções obtidas por inoculação de material de barbeiros; nas inoculações de sangue contaminado, conforme assinalámos, encontram-se não raro parasitos jovens durante a fáse sanguinea inicial, aumentando em numero ao começar a invasão do sangue pelas tripanosomas recemformados nos tecidos. Nos frottis de orgãos de animais injetados com sangue e sacrificados ao fim do periodo de incubação, encontram-se, ao lado de fórmas de evolução mais atrasadas, tripanosomas jovens, intracelulares ou não, morfologicamente muito semelhantes aos tripanosomas metaciclicos (gatinhos, 5 dias).

É sabido que o *S. cruzi* não se divide no sangue; mas muito raramente aí se encontram parasitos com sináes de divisão (Chagas). No sangue periferico de uma cobaia esplenectomisada vimos uma vez um tripanosoma provido de dois nucleos e dois flagelos e blefaroplasto volumoso (fig. 1). Estas fórmas excepcionais devem provir de critídias que antes de terminar a divisão iniciaram sua transformação em tripanosoma, deixando prematuramente a situação intracelular; é mais admissivel considera-las como individuos procedentes dos tecidos e de evolução incompleta, do que parasitos dividindo-se precocemente no sangue, destinados a terminar a divisão no interior dos elementos anatomicos.

Algumas vezes tem sido assignalada a presença de corpusculos leishmaniformes no sangue periferico de animais infectados pelo *S. cruzi*. Em esfregaço de sangue de cão muito infectado encontrámos uma vez um macrofago encerrando tres leishmanias; nunca vimos parasitos arredondados, sem flagelo, livres no plasma sanguineo.

S. cruzi nos tecidos — Sistema reticulo-endotelial —

O *S. cruzi* é mais um parasito dos tecidos do que do sangue (Chagas). Dentro de certos elementos anatomicos este parasito toma a fórma

de um corpusculo ovoide, de nucleo arredondado e blefaroplasto em fórma de bastonete, sem flagelo: é o corpusculo leishmanifórme ou *leishmania*, descoberto independentemente por Hartmann e Gaspar Vianna. A multiplicação intracelular se faz por divisões binarias sucessivas, havendo excepcionalmente divisão multipla de que resultam 4 ou mais individuos. As leishmanias, depois de se multiplicarem, passando transitoriamente pela fórma de critídia, sob a qual ainda se pódem dividir, transformam-se em tripanosomas jovens que ganham a torrente circulatoria.

Desde os primeiros trabalhos em que se estudaram as localizações parasitarias nos tecidos do homem e dos animaes infectados pelo *S. cruzi* tem sido assignalada a existencia de fórmas de multiplicação deste flagelado no interior de celulas que hoje são reconhecidas como pertencentes ao sistema reticulo-entotelial. Mais recentemente, Souza Campos tem estudado as alterações de tais celulas ao decorrer da infecção experimental, e nós mesmo (1932) procurámos demonstrar a grande afinidade do *S. cruzi* pelos elementos deste sistema organico.

Estudaremos a evolução da infecção nos animais de laboratorio, principalmente o cão, considerando a distribuição dos parasitos e suas relações com o sistema reticulo-endotelial:

— Como já foi referido precedentemente, os tripanosomas inoculados penetram em grande numero nas celulas do ponto de inoculação, que constituem inicialmente a séde de multiplicação mais importante, localizando-se depois, com a progressão da infecção, em outros orgãos, onde tambem se acumulam em grande quantidade. Em cães inoculados sob a péle com sangue de animal infectado, encontram-se poucos dias depois da inoculação numerosas celulas do « reticulo-periferico » e clasmatocitos da região injetada cheios de parasitos (fig. 2). Entre as primeiras, chamamos a atenção especialmente para as celulas do reticulo sarcolemico dos musculos do esqueleto, pelo fáto de que algumas vezes os parasitos nelas contidos pódem ser tomados como localizados na propria fibra muscular, sendo em certos casos dificil determinar sua situação.

Nos primeiros dias de infecção quasi a totalidade das leishmanias do ponto inoculado estão no interior destas celulas e não na musculatura; porém, num cão sacrificado 5 dias depois da inoculação, já vimos parasitos no interior da propria fibra muscular. As celulas do ponto de inoculação mais frequentemente parasitadas são as celulas do tecido conjuntivo frouxo, clasmatocitos e celulas migradoras (fibrocitos?) [1]

[1] Para esclarecimento da nomeclatura dos elementos do S. R. E., de que nos servimos, vêr M. Volterra (1927), G. Gugglielmo (1933).

Os elementos reticulo-histiocitarios dos ganglios linfáticos vizinhos á região inoculada são tambem cedo invavidos pelos parasitos. Num cão morto no 12.º dia de infecção encontramos nestes ganglios perifericos numerosas celulas muito intensamente parasitadas (fig. 3-4).

Espalhando-se pelo organismo do vertebrado, o *S. cruzi* invade todos os territorios do sistema reticulo-histiocitario, parasitando numerosos de seus elementos, que são de um modo geral as celulas do reticulo dos orgãos hemolinfopoiéticos, as celulas do reticulo endotelial, as celulas do reticulo periferico, e os clasmatocitos, fibrocitos e celulas migradoras do tecido conjuntivo. As fórmas de multiplicação são encontradas em quasi todos os orgãos, quasi sempre no interior dos elementos deste sistema. Os orgãos mais intensamente afetados, nos cãis infectados experimentalmente, são o baço, o figado, os orgãos hemolinfopoiéticos e o coração.

O *S. cruzi* não é um parasito exclusivo do sistema reticulo-histiocitario. Entre as localizações deste protozoario em elementos extranhos a este sistema organico, a mais importante é a constituida pela musculatura estriada, compreendendo o coração e os musculos do esqueleto. As celulas do testiculo (Gaspar Vianna), a nevroglia e algumas vezes os proprios neuronios (Souza Campos, E. Villela) têm sido encontrados com parasitos no seu interior. Assinalemos tambem a microglia, que segundo alguns autores faz parte do sistema reticulo-histiocitario, e que constitue uma das localizações do *S. cruzi* no sistema nervoso central de cães infectados (Villela e Villela, 1932).

A distribuição do *S. cruzi* nos orgãos do vertebrado póde variar segundo circunstancias indeterminadas, que parecem depender mais do proprio parasito que no seu hospedador, pelo menos relativamente ao parasitismo do sistema reticulo-endotelial. Nas infecções produzidas pela raça de tatú a localização do *Schizotrypanum* nas celulas deste sistema é muito mais exclusiva: não temos encontrado leishmanias nas fibras cardiacas de cães senão excepcionalmente e nunca as vimos nas de cobaias infectadas por aquela raça. Nos tatús apanhados com infecção natural, os unicos elementos parasitados que temos verificado são os gigantocitos quisticos (fig. 6) descritos por Torres e Penna de Azevedo e que, segundo estes autores, parecem originar-se de histiocitos perivasculares. O parasitismo das proprias fibras musculares, estriadas ou lisas, principalmente as do coração, é muito mais comum nos animais infectados com virus proveniente do homem ou do cão.

Segundo Chagas, o musculo cardiaco é séde de eleição do parasito nas infecções humanas. A respeito da predileção pelo coração temos interessante observação em cão por nós achado com infecção natural nos

arredores de Lassance: ao passo que nos orgãos não foram encontradas leishmanias (baço, figado, pulmão, ganglio, intestino delgado), apezar de serem numerosos os parasitos no sangue, no coração existem em abundancia, incluidas nas fibras musculares e nas celulas do reticulo, havendo intensa miocardite instersticial. No coração tambem ás vezes é dificil julgar si os parasitos estão dentro destas celulas ou no proprio interior do elemento contrátil.

A preferencia de raças isoladas do tatú pelo sistema nervoso de cãis experimentalmente infectados foi observada por Villela e Torres (1926) e Villela e Villela (1932); si bem que abundantes em diversos elementos do sistema nervoso central (macroglia, microglia, celulas neuronais, macrofagos, celulas perivasculares), as leishmanias eram raras ou ausentes no coração (1932). O acentuado neurotropismo dessas raças traduzia-se clinicamente por varios sintomas, nos cãis, principalmente por paralisias.

Entre as localisações mais raras do *S. cruzi* citaremos a verificada por C. Chagas Filho (observação inédita) nos glomerulos renais de um cão infectado por uma amostra recentemente isolada do tatú. Nunca observámos fórmas de multiplicação no interior de celulas parenquimatosas (figado, rim, supra-renal, etc.).

Segundo os resultados de Souza Campos, os elementos do SRE de cãis com infecção congenita são tambem eletivamente parasitados.

— Em outras parasitoses em que o agente etiologico é tambem estritamente adaptado ao SRE, tem sido igualmente verificada sua localisação em elementos extranhos e este sistema. Assim, no Kala-Azar natural ou experimental, póde-se encontrar celulas nobres parasitadas pela *Leishmania donovani*, embora raramente, no figado, rim, glandula supra-renal, pancreas (vêr Laveran 1917).

Gaspar Vianna (1914) observou a presença de parasitos nas fibras musculares de uma arteriola num caso de leishmaniose cutanea (*Leishmania brasiliensis*), fato este que não foi novamente observado, a nosso conhecimento.

O *S. cruzi* é menos estritamente adaptado ao SRE do que os parasitos do genero *Leishmania*, e sua distribuição no organismo do vertebrado muito mais geral do que a destes protozoarios, no caso de infecções agudas. Este fato é explicavel si se considera a existencia, na tripanosomiase, de intensa infecção sanguinea produzida por fórmas flageladas extracelulares, o que não ocorre nas leishmanioses. Na leishmaniose visceral, em que a presença de parasitos aflagelados no sangue é muito frequente, as relações das leishmanias com o SRE e sua distribuição no organismo assemelham-se bastante ás do *S. cruzi*, principalmente pelas suas afinidades pelo SRE.

A grande afinidade do *S. cruzi* pelo SRE traduz-se pela penetração precoce do parasito em seus elementos, seguida de intensa multiplicação e posterior invasão de todos os distritos do sistema. Conforme a raça do tripanosoma e sua virulencia, como vimos, varía a distribuição dos parasitos no organismo, mas sempre se observa sua tendencia a invadir os elementos reticulo-histiocitarios. Acreditamos ser o *S. cruzi* um parasito primitivo do SRE, posteriormente adaptado e ainda com diversos gráus de adaptação a elementos não pertencentes a este sistema.

A proposito da afinidade do *S. cruzi* pelo SRE é interessante recordar as experiencias de Szent-Gyorgyi (1921) sobre galvanotropismo de diversos microorganismos. Este autor verificou que o *S. cruzi* e a *L. donovani* são anódicos, isto é, comportam-se num campo eletrico como os coloides eletro-negativos; são justamente os que têm afinidade pelo SRE. Os tripanosomas sanguineos, não histoparasitos (*T. brucei*, *T. gambiense*, *T. rhodesiense*, *T. equiperdum*) são catódicos. O *T. theileri* é anódico (tecidos?) [2].

Relativamente ao mecanismo de penetração do *S. cruzi* nas celulas reticulo-histiocitarias, tudo leva a crêr tratar-se de um processo ativo por parte do parasito, considerando-se sua grande penetrabilidade atravez os tegumentos e sua capacidade de se alojar no interior de fibras musculares e outros elementos incapazes de um englobamento ativo. As celulas do SRE não exercem uma ação « fagocitaria » sobre os tripanosomas, mas são por eles penetradas; aliás, segundo a teoria de Schulemann, mesmo o englobamento de agentes inanimados não seria um processo ativamente exercido por estas celulas, mas sim um fenomeno fisico principalmente (vêr R. Freund 1933).

— Conhecidas as afinidades biologicas do *S. cruzi*, é de crêr que um tratamento eficaz da doença de Chagas só poderá ser conseguido por um agente terapeutico coloidal.

A expressão anatomo-pathologica do parasitismo do SRE pelo *Schizotripanum* é constituida principalmente pela hipertrofia e hiperplasia de seus elementos.

Papel defensivo do SRE na infecção pelo *S. cruzi*.

A estrita adaptação de certos parasitos (*Schizotrypanum*, *Leishmania*) aos elementos reticulo-histiocitarios, que representam no organismo a séde de eleição de suas localisações e de sua multiplicação, parece indicar

---

[2] Vêr M. Carpano, 1932.

por si mesma que nenhuma ação protetora contra eles exerce o « sistema de defeza fagocitaria ».

No inicio da infecção, como vimos, a penetração do *Schizotrypanum* nas celulas de origem mesenquimatosa é seguida de intensa multiplicação; terminada a evolução, sem que haja sinais de degeneração, os parasitos passam para o sangue, invadindo depois os orgãos, em cujas celulas se introduzem e evoluem do mesmo modo. Quando a molestia progride agudamente, terminando pela morte, é enorme a quantidade de celulas do SRE e outros elementos parasitados; passando á cronicidade, pela diminuição ou desaparecimento dos tripanosomas da circulação, encontram-se nos tecidos de homens e animais aparentemente restabelecidos celulas reticulo-endoteliais encerrando leishmanias, ás vezes longo tempo depois de decorrida a fase sanguinea da infecção.

Estes fatos mostram que o SRE não exerce nenhuma ação defensiva diretamente, isto é, por destruição imediata dos parasitos contidos em seus elementos. Possivelmente o SRE intervirá indiretamente, mediante a formação de anticorpos especificos, na defesa do organismo contra o *S. cruzi*; mas mesmo esta intervenção no estabelecimento da imunidade humoral na tripanosomiase americana ainda carece de demonstração. Si as experiencias em animaes esplenectomisados pódem ser tomadas como conclusivas, dever-se-á admitir como não existente a participação deste sistema na formação de anticorpos, na referida infecção

—A existencia de uma ação protetora tem sido demonstrada em diversas infecções. Para se comprovar experimentalmente a ação defensiva deste sistema são geralmente empregadas duas técnicas, por meio das quais procura-se conseguir uma relativa paralisação, ou realiza-se uma restrição numerica de seus elementos. No primeiro destes processos empregam-se os os chamados «bloqueios» por meio de agentes diversos; no segundo faz-se a extirpação do baço, orgão que representa importante territorio do SRE.

Submetido o animal a qualquer destas tecnicas, ou a ambas ao mesmo tempo, verifica-se depois sua resistencia a determinado germen, comparativamente á de animais integros. Tem-se estudado tambem a capacidade de produção de anticorpos em animais assim tratados, com o fim de elucidar o possivel papel do SRE na sua formação. Kurotchkin e Chung (1930) verificaram que a formação de aglutininas em animais experimentalmente infectados pela *Leishmania donovani* ou bloqueados por agentes inanimados, era consideravelmente menor que nos animais normais.

As tecnicas de bloqueio e esplenectomia não representam meio bastante seguro para a investigação de certos problemas, pois as alterações sofridas por organismos a elas submetidos não poderão ser atribuidas exclusivamente ás modificações sofridas por sistema reticulo-histiocitario.

Esplenectomias.—Alguns autores estudaram a marcha da infecção pelo *S. cruzi* em animais privados de baço. Kritschewski e Schwarzmann (1928) não observaram nenhuma modificação nas infecções em camondongos esplenectomisados depois de aparecerem os tripanosomas no sangue periferico. Nieschulz e W. Rontœ (1930), retirando o baço de cãis varios dias antes da inoculação, chegaram tambem á conclusão de que o SRE não exerce ação protetora nessa infecção. H. Galliard (1930) verificou que pela inoculação do *S. cruzi* a animaes esplenectomisados, ou pela ablação do baço durante o curso da infecção, não se consegue modificar de modo sensivel o curso desta, parecendo que os camondongos operados contraem mais rapidamente a imunidade que os normaes. Este autor não obteve infecção mortal em ratos operados, inoculando raças virulentas de *S. cruzi*. P. Regendanz (1930) tambem trabalhando com ratos adultos esplenectomisados não verificou diminuição de sua resistencia; segundo informação verbal deste pesquizador, em numerosas experiencias inéditas que fez com Kikut, não foi constatada nenhuma alteração na marcha da infecção pelo *S. cruzi* em camondongos, cãis e cobaias operadas. Pelas experiencias de Kofoid e Donat (1933) a extirpação do baço parece favorecer o aparecimento dos parasitos no sangue periférico de ratos inoculados.

Nas nossas experiencias, muito pouco numerosas, feitas em diversos animais (cobaia, cão, camondongo), não observámos modificações sensiveis na evolução da infecção pelo *Schizotrypanum* após a esplenectomia.

Seguem-se algumas de nossas observações:—Camondongo inoculado em 27-I-33 (sangue), exames: positivo 6-II-33, negativos 16, 26 e 27-II-33. Operado neste dia, continuou com exames negativos até 17-III-33.

—Camondongo branco. Ingeriu dejeções de triatomas infectados em 16-XI-aparecendo parasitos no sangue em 1-XII-32. Até 27-I-33 teve sempre poucos tripanosomas na circulação, sendo neste dia inoculado com *S. cruzi* (sangue de cão); a infecção sanguinea não se modificou até 27-II-33, quando foi esplenectomisado. Continuou com raros parasitos no sangue até 17-III-33, tendo tido ligeiro aumento do numero de parasitos em 3-III-33, aumento esse que foi, além de fraco, muito transitorio.

—Cobaia que resistiu a repetidas inoculações de *S. cruzi* de diversas origens, provavelmente imunizada por uma infecção anterior; Inoculações 20-X-32 (liquido hialino de barbeiros infectados), 13-XII-32 (fezes de *T. megista*), 13-I-33 (sangue de cobaia-raça de tatú). Teve sempre exames de sangue negativos.

Operada em 3-III-33, continuou negativa até 13-III-33. A reação de Machado (feita por E. Villela) havia sido fortemente positiva em 10-II-33.

Bloqueios

Acompanhando autores que estudaram a leishmaniose viceral (Pittaluga, Kurotchkin e Chung), cujo agente etiologico é estritamente adaptado ao SRE, dissemos em uma comunicação anterior (1932) que a tripanosomiase americana experimental é um exemplo de bloqueio biologico deste sistema.

De fato, nos animais em que as amostras virulentas de *S. cruzi* produzem intensas infecções (especialmente o cão), os parasitos, invadindo e proliferando no interior de numerosos de seus elementos, determinam verdadeiro «bloqueio» parasitario ou biologico de tal sistema. Estas expressões, no caso, são de toda propriedade, uma vez que não se considere o termo «bloqueio» no antigo sentido, isto é, como indicativo de uma inibição ou paralisação total dos elementos do SRE pelos agentes englobados. A noção de bloqueio total não é mais admissivel por diversas razões, entre as quaes a da possibilidade de se realizarem bloqueios por dois ou mais agentes sucessivamente.

—Fizemos varias experiencias com o fim de observar as ações reciprocas dos bloqueios biologico e coloidal.

Estudando a distribuição dos coloides e dos parasitos nos animais injetados primeiramente com um destes agentes e depois com o outro, verificámos que de um modo geral ambos se distribuem independentemente pelos elementos do SRE. Relativamente ao numero enorme de celulas no interior das quaes ha parasitos ou coloide floculado, aquelas que encerram a ambos constituem raridade. Assim, nos animais muito infetados, em que se injeta por via sanguinea um preparado coloidal, observa-se que este é fixado em grande parte pelos elementos não parasitados, excepcionalmente pelas celulas infetadas. Entre estas celulas o englobamento do coloide dá-se mais frequentemente pelas que contêm pequeno numero de leishmanias.

A coexistencia de parasitos e coloides no interior da mesma celula observa-se tambem nos animais préviamente bloqueados em que se inocula o *S. cruzi*.

Da verificação de uma menor atividade coloidopexica dos elementos parasitados, nos animais com tripanosomiase americana experimental, póde-se concluir que nesta infecção ha um bloqueio relativo do SRE, determinado pela proliferação do *S. cruzi* no interior das celulas reticulo-histiocitarias.

Sobre possiveis modificações da evolução da infecção em animais submetidos a bloqueios coloidaes, antes ou depois da inoculação do parasito, nada concluimos das experiencias que fizemos. Seguem-se os protocolos de

algumas destas experiencias, destinados a mostrar principalmente a distribuição dos parasitos e dos coloides no organismo.

Experiencias com Torotraste.

Cão T. 1—900 gr.—Inoculado em 14-IV-32 intraperitonialmente com sangue de cobaia pouco infetada (raça de tatú), reinoculado no dia seguinte com sangue de cão bem infectado (11º dia, raça humana), no peritonio (2 cc.) e sob a péle (0,5 c.c.). Em 20-IV estava regularmente infectado; em 21 e 22 foi injetado na veia com 4 c.c. e 3,5 c.c. de torotraste (mistura em partes iguais de T. e sôro glicosado a 5 %). Morreu no 11.º dia de infecção (25-IV-32).

Exame dos esfregaços—Baço: numerosas celulas com deposito pardo amarelado, numerosas leishmanias. Foi encontrada uma fórma parasitaria em divisão multipla, encerrando 5 nucleos e 5 blefaroplastos. Medula ossea-numerosas leishmanias, poucas celulas com T. Sangue: monocitos com plasma muito corado parecendo conter T.; alguns com leishmanias e restos de tripanosomas (exame feito quanto tempo depois da morte ?).

Exame dos córtes—(alcool absoluto, hematoxilina-eosina)—Figado: celulas parasitadas pouco numerosas, algumas encerrando granulos de T. Grande numero de celulas com deposito de T., sob a fórma de granulos grandes e irregulares, pardacentos ou quasi incolores. Coração: Celulas e fibras musculares parasitadas; raras destas celulas contêm pequeno numero de granulos que por sua coloração e refringencia parecem ser de T. Algumas celulas não parasitadas com coloide floculado. Rim: ausencia de leishmanias, granulos de T. só nos glomerulos. Cerebro: grãos de T. quasi incolores e refringentes distinguiveis em poucas celulas; ausencia de parasitos. Baço: numerosas celulas cheias de T. Grandes fócos de leishmanias. Raras celulas com coloide e parasitos.

Cão T. 2—1200 gr.—Sofreu as mesmas inoculações de parasitos que o cão precedente, em 14 e 15-IV-32. Em 21 e 22-IV-32, inoculações intravenosas de 5 a 4 cc. da mesma mistura de T. e sôro glicosado. No dia 23 tinha bastantes parasitos no sangue, morrendo com bôa infecção em 26-IV-32.

Frotis—Baço: numerosas celulas parasitadas e numerosas celulas carregadas de T. Ganglio: enorme quantidade de leishmanias e tripanosomas. Figado: tripanosomas sanguicolas. Medula ossea: numerosos parasitos, raras celulas encerrando leishmanias e granulos de T. Sangue: numerosos tripanosomas.

Córtes—(alcool absoluto, H. E.)—Figado: numerosas celulas bloqueadas pelo coloide, algumas com parasitos. Baço: celulas parasitadas em pequeno numero; encontram-se destas celulas com T. Grande numero de elementos fortemente carregados de T. Ganglio: grande quantidade de celulas bloqueadas; as que contem leishmanias e T. são como sempre em pequeno numero.

Cão T. 3—1100 gr.—Inoculado na veia em 15, 16 e 18-IV-32 respectivamente com 3, 3, e 3,5 de T. (a 50 % em sôro glicosado).

No dia 21, portanto 6 dias após a primeira injeção de T. foi inoculado na jugular com sangue de cão (raça humana, 7 dias). Morreu em 26-IV-32, tendo tido exame negativo em 21 e positivo em 25. Frotis.— Baço: raras leishmanias, algumas atipicas, numerosas celulas vacuolizadas e granulosas (T). Piroplasmose. Ganglio: celulas com T., ausencia de parasitos. Medula ossea: raras celulas T., raros parasitos esparsos; algumas celulas de grandes dimensões e nucleo multiplo, com numerosissimas leishmanias.

Córtes: (alcool absoluto, H. E.)—Figado: grande numero de celulas com deposito de T. Foi encontrada uma grande celula do SRE encerrando 12 leishmanias e granulos de T.; foram estes os unicos parasitos achados. Baço: muito numerosas celulas com T., parasitos ausentens. Ganglios fortemente bloqueados pelo T., sem leishmanias. Pulmão: celulas com T., sem parasitos.

Cão T. 4—1050 gr.—Injetado em 15 e 16-IV-32 com 3 e 3,5 c.c. de T. na veia, e com sangue de cão (raça humana, 7 dias de infecção) em 21-IV-32 tambem na veia. Em 25-IV tinha tripanosomas no sangue, morrendo em 27.

Frotis: não foram encontrados parasitos nos orgãos (figado, baço, ganglio, medula ossea). Piroplasmose.

Córtes: Figado e baço com grande numero de celulas cheias de T. No coração, algumas celulas encerrando pequenos grãos ligeiramente corados pela hematoxilina (T. ?). Não foram vistos parasitos em nenhum córte.

Experiencias com Colargol (Silva Araujo)

Cão Colargol 1—900 gr.—Inoculado em 23-I-32 com *S. cruzi,* raça humana, foi injetado na jugular em 30-I-32 com 3 c.c. de Colargol, já com numerosos tripanosomas no sangue. No dia imediato estava á morte, sendo sacrificado tendo decrescido ligeiramente o numero de parasitos no sangue.

Córtes: Figado—grande numero de celulas impregnadas pelo coloide. Algumas celulas com poucos parasitos contém tambem Colargol; as muito infectadas não o contêm. Degeneração gorda acentuada; fócos esparsos de necrose. Baço: numerosas celulas carregadas de Colargol. Raras celulas com coloide e parasitos em pequeno numero. Grandes celulas bem parasitadas encerrando goticulas de gordura. Rim: celulas dos glomerulos e dos tubulis com granulos de colargol; raras celulas parasitadas. Degeneração gorda. Coração: grandes celulas com numerosos parasitos; celulas esparsas encerrando colargol.

Cão Colargol 2—990 gr.—Inoculado em 13-V-33 com sangue de cão infectado (raça de cão, 2a. passagem). Em 27-V-33 foi injetado com 1 cc. de Colargol (injeção intracardiaca). Estava muito infectado; sacrificado (cloroformio) 15-20 minutos depois da injeção de Colargol. Orgãos fixados em alcool absoluto e formol a 10 %.

Córtes (H. E.)—Figado: numerosas celulas parasitadas, raras das quaes encerram alguns granulos de coloide. Grande numero de celulas normais fixou o Colargol. Baço: enorme quantidade de celulas infectadas;

Colargol em menor quantidade que no figado e menos discernivel, distribuido por celulas não parasitadas. Coração: muito raras celulas parasitadas, Colargol ausente. Pulmão: raras celulas com parasitos, bastantes celulas com coloide, sómente (este póde ser confundido com pigmentos de origem sanguinea). Supra-renal: exame negativo para parasitos e coloide. Ganglio mesenterico: raros parasitos. Ganglio periférico: numerosissimos parasitos, pequena quantidade de prata.

O deposito de Colargol é mais abundante no figado; os parasitos são mais numerosos no baço, figado e ganglio periferico. É interessante notar sua pequena quantidade no coração (raça de cão).

Cão Colargol 3 — 1860 gr. — Inoculado em 12-V-33 com *S. cruzi*, raça de cão, 2.ª passagem, foi injetado no coração em 8-VI-33 com 1 cc. de Colargol e morto pelo cloroformio cerca de 20 minutos depois. Material fixado em formol a 10 % e alcool absoluto.

Córtes (H. E.)—Figado: numerosas celulas bloqueadas pelo parasito ou pelo coloide; não vi elementos encerrando a um tempo ambos agentes bloqueantes. Baço, idem, menor quantidade de colargol. Pulmão: pouco colargol, não ha parasitos. Coração:. leishmanias abundantes, não vi celulas com coloide. Ganglio linfatico: enorme quantidade de celulas parasitadas.

Cão Colargol 4—1200 gr.: — Cão normal, injectado na jugular com 1 cc. de Colargol (6-VI-33) e duas horas depois com 3-4 cc. de sangue de cão infectado (raça de tatú, 3.ª passagem). Foi sacrificado em 12-VI-33, 6 dias depois, já com bastantes tripanosomas no sangue. Orgãos fixados em alcool absoluto e formol 10 %.

Córtes (H. E.)—Figado: poucas celulas com Colargol em fórma de grãos aamarelos homogeneos (alcool absoluto); poucas celulas parasitadas. Baço: coloide e parasitos mais abundantes, poucas celulas com colargol. Pulmão: ausencia de leishmanias — poucas celulas com prata. Ganglio: ausencia de coloide e de parasitos, coração e supra-renal idem. Num córte de figado (formol) encontrámos uma celula com leishmanias e grãos de colargol.

Bloqueio local:

Cão A—950 gr.—Foi inoculado sob a pele da região inguinal esquerda com sangue de cobaia pouco infectada por *S. cruzi*, raça de tatú (dia 26-I-32). No dia seguinte foi reinoculado com sangue da mesma cobaia, subcutaneamente, na região inguinal direita e no abdomen. Em 31-I-32 foi injetado com 1 cc. de carmin a 1/3 (Ribbert) e 1 cc. de tinta da China, nos pontos inoculados com tripanosoma em 27-I-33. Em 1-II-32, 1 cc. de Colargol na região injetada em 26-I-32. Este cão teve raros tripanosomas no sangue em 30, 31 e 1.º, tendo sido sacrificado em 2-II-32, ainda com raros parasitos na circulação, Os pontos de inoculação foram fixados separadamente em alcool absoluto, formol a 10 % e Zenker.

Nos córtes os parasitos eram pouco numerosos; como nas experien-

cias precedentes, só raras celulas encerravam ao mesmo tempo leishmanias e coloide. Neste caso, observámos celulas parasitadas contendo tinta da China ou Colargol (fig. 5). Os dados exatos sobre esta experiencia são os que acabamos de referir; na nossa publicação anterior (1932) houve certos enganos na sua exposição.

IMUNIDADE

O capitulo da imunidade na doença de Chagas oferece largo campo á pesquisa cientifica. Apesar de possuirmos muitos dados importantes devidos aos trabalhos de Chagas, Machado e Guerreiro, Villela, Lacorte e outros, numerosas questões estão ainda por resolver.

O estudo deste assunto, que exige certa especialisação, não foi particularmente feito por nós: daremos a seguir alguns dados, na maioria confirmativos dos de outros autores, sobre a imunidade, natural ou adquirida, á infecção pelo *S. cruzi*.

IMUNIDADE ADQUIRIDA

Fáto para o qual chamou Chagas a atenção, deste suas primeiras pesquisas sobre a tripanosomiase, foi a transitoriedade da fase inicial da infecção, durante a qual os parasitos encontram-se mais ou menos numerosos na circulação. Após atingir um maximo, variavel com a virulencia do germe e a resistencia do organismo, o numero de tripanosomas vae decrescendo progressivamente, até que se tornam muito raros ou desaparecem do sangue periferico. A redução numerica dos flagelados na circulação é, segundo Chagas, devida a condições de defeza que se vão creando no organismo; a infecção passa á cronicidade, ficando os parasitos cantonados nos tecidos, de onde esporadicamente saem tripanosomas para o sangue, geralmente em numero muito reduzido. Em varios animais evolue a molestia, espontanea ou experimental, do mesmo modo que no homem, tornando-se cronica, sempre conforme a virulencia ou a quantidade dos parasitos que se introduziram no organismo e as condições de defeza organica; evidentemente, estão excluidas as infecções agudas, que tanto no homem como nos animais pódem terminar pela morte durante a fase septicemica.

Não está esclarecida a natureza dos anticorpos existentes no sôro sanguineo do homem e dos animais infectados pelo *S. cruzi*; sua existencia no sôro póde ser determinada pela reação de fixação do complemento, especifica em presença de antigeno adequado, devida a Guerreira e Machado (1913). Poderosas contribuições demonstrativas do valor desta reação como elemento de diagnostico são os trabalhos de J. G. Lacorte e E. Villela. Nos nossos animais de experiencia,

E. Villela tem feito a reação de Machado com resultados sempre uniformes.

— O homem e os animais que sofreram a infecção pelo *S. cruzi* adquirem um certo gráu de imunidade contra este parasito. O fáto de se conseguir isolar o tripanosoma do sangue de casos cronicos de doença de Chagas, sujeitos ou não á reinfecção, e as recidivas ás vezes mortais já observadas em animais, (Rocha Lima, Blanchard), mostram que esta imunidade é muito relativa. As reinoculações em animais infectados demonstram entretanto uma grande resistencia ás reinfecções.

E. Brumpt, Mayer e R. Lima, foram os primeiros a verificar a insensibilidade de animais infectados a novas inoculações. Brumpt (1913) observou que camondongos que sobreviveram á infecção resistem á inuculação de uma amostra virulenta e mortal para camondongos normais. Fáto semelhante foi observado por Colier (1931) em camondongos que sofreram uma infecção por um virus atenuado pela tripaflavina.

As observações que possuimos sobre o resultado de reinoculações são as seguintes:

—*Cobaia 1* (470 gr.)—Este animal servira para alimentar os numerosos barbeiros da criação, provenientes de Lassance e em grande parte infectados, ficando em contacto com eles por varias vezes. Adquiriu provavelmente a infecção, que não foi pesquizada. Em 20-X-32 foi inoculado em varios pontos com grande quantidade de dejeções de *T. megista* muito ricas em tripanosomas metaciclicos. Examinada quasi diariamente, teve, até 14-XI-32, 19 resultados negativos. Continuou sempre negativa até 13-III-33, tendo sofrido mais duas inoculações: em 13-XII-32 (conteúdo intestinal de ninfa muito infectada) e 13-I-33 (sangue de cobaia parasitada com virus do tatú). No dia 27-I-33 foi sangrada para experiencias de proteção (ver adiante); em 10-II-33 a reação de Machado (E. Villela) foi fortemente positiva; em 3-III-33 foi retirado o baço, o que não determinou o aparecimento de tripanosomas até 13 do mesmo mês. Esta experiencia mostra a resistencia do animal imune tanto ás fórmas metaciclicas quanto ás fórmas sanguicolas do *S. cruzi*.

—*Cobaia 4*—(470 gr.)—Infectada através a pele em 11-VII-32, com dejeções limpidas de triatomas, teve exames positivos de 27-VII a 22-IX-32. Exames negativos: 4-X; 12-X-32; 13-XII-32; 1-III-33; 8-V-33. Nesta data foi inoculada com *S. cruzi* (raça de tatú); exame negativo em 13-V-33; em 19-V-33 tinha raros tripanosomas no sangue; de 22-V em diante teve numerosos exames negativos, estando ainda viva (30-X-33). Em 2-VI-33 a reação de Machado foi positiva. Foi sangrada em 3-III-33 para experiencias de proteção (ver adiante).

—*Cobaia 7*—(780 gr.)—Infectada por deposição de dejeções de barbeiro no olho, em 11-VII-32. Exames positivos de 28-VII a 24-X-32, negativo 10-XI-32. Em 13-XII-32 sofreu inoculação intraperitonial de con-

teúdo intestinal de ninfa muito infectada (material que tambem serviu para a cobaia 1), tendo exames negativos de 17-XII-32 a 4-I-33. Examinada a 27-I-33, tinha regular infeção sanguinea; morreu a 6-II-33. (Fôra sangrada no coração em 27-I-33).

—*Camondongo 4*—Colocada sobre a pele 1 gota de urina limpida de triatoma com numerosos metaciclicos (29-XII-32), manifestou-se a infecção 13 dias depois (exames positivos 11 e 20-I-33); foi inoculado em 27-I-33, já sem tripanosomas no sangue ao exame a fresco (mesmo resultado em 1-II-33). Raros parasitos no sangue em 3-II-33; exame novamente negativos 6, 17, 26-II-33. Morreu em 27-II-33 quando estava sendo esplenecetomisado.

—*Camondongo 2*— Infectado através a pele por fórmas metaciclicas. Exames positivos de 12-XI a 29-XII-32 (dejeções depositadas na pele em 1-XI-32). De 2 a 20-I-33 teve 2 exames negativos e 4 positivos (em 20, positivo). Inoculado em 27-I-33: exames positivos 1 e 6-II-33, negativos 27 e 28-I, 3, 7, 17, e 26-II-33. Morreu, como o precedente, em 27-II-33.

—*Camondongo 7*—Infectado por via digestiva com dejeções de triatoma, em 16-XI-32. Teve sempre raros tripanosomas no sangue, de 1-XII-32 a 17-III-33, apesar de reinoculado em 27-I-33 com sangue de cão infectado (raça humana) e de ter sido esplenectomisado em 27-II-33.

— Pelo que expusemos, vê-se que nos animais que já tiveram a infecção a reinoculação do *S. cruzi*, póde ou não determinar o reaparecimento de tripanosomas no sangue; este, nos casos em que se dá, é em geral transitorio. Algumas vezes não se póde dizer si o reaparecimento da infecção sanguinea foi devido á nova inoculação, ou a uma recidiva dela independente (cobaia 7).

A inoculação de tripanosomas nos animais ainda com raros parasitos na circulação não modifica sensivelmente o aspeto sanguineo da infecção.

Parece que, pelo menos até certo tempo, os animais que sofreram a infecção, quer sejam ou não reinoculados, estão nas mesmas condições relativamente á existencia ou á intensidade da infecção sanguinea. De facto, si de um lado as reinoculações não modificam sua intensidade e poderão ou não faze-la reaparecer, de outro lado, no sangue de animais não inoculados novamente pódem reaparecer tripanosomas espontaneamente.

A possibilidade de se isolar o *Schizotrypanum* do sangue, e a persistencia da positividade da reação de Machado, de enfermos cronicos da doença de Chagas, longos anos depois de afastados das zonas de barbeiro,

demonstram que a infecção humana é muito duradoura, independentemente de reinoculações.

Em doentes internados no Hospital Oswaldo Cruz no serviço do Dr. E. Villela, tem-se observado a presença de tripanosomas no sangue por inoculação em cobaia até depois de mais de 2 anos de hospitalisação; em outros doentes (America, Teodora) isolados ha mais ou menos 10 anos, a reação de Machado ainda é positiva.

Segundo M. Torres (1930) o homem com infecção cronica, residente nas zonas infectadas por muito tempo, não é insensivel ás reinoculações a que está continuamente exposto em condições naturais, sendo devida ás reinfecções a evolução progressiva do processo de miocardite. A susceptibilidade a reinfecções seria devida á transitoriedade da imunidade adquirida; a permanencia de fórmas de multiplicação nos tecidos seria tambem transitoria.

Ação protetora do sôro de animais imunes.

Mayer e Rocha Lima (1914) verificaram que o sôro de animais (ratos, cobaias e coelhos) ativamente imunizados por repetidas inoculações de *S. cruzi*, não proteje camondongos normais quando inoculado separadamente ou em mistura com fórmas sanguicolas deste tripanosoma. A injeção de sôro 24 horas antes da inoculação de parasitos tambem não exerce nenhuma ação protetora. Não observaram modificações na marcha da infecção nos animais experimentados. A injeção de sôro em animais muito infectados não retardou a morte.

A acção protetora de sôros de cobaias imunes, em condições que mais favoreceriam sua realisação, tambem não foi observada em nossas experiencias.

1)—Sôro de cobaia que resistiu a varias inoculações (cobaia 1) foi aquecido 1/2 hora a 45° (para matar tripanosomas porventura existentes) e posto em contacto a 37° durante 1 hora com fórmas metaciclicas (urina de T. megista) e sanguicolas (sangue de cão, raça humana) do *S: cruzi*. Foram inoculados 2 camondongos normaes:

Camondongo A—Inoculado (via subcutanea) com a mistura de sôro e tripanosomas metaciclicos; examinado 10 dias depois, tinha parasitos no sangue. Foi sacrificado 20 dias depois da injeção, com forte infecção.

Camondongo B—Injectado (via peritorial) com sôro e tripanoso mas sanguicolas, teve infecção benigna e transitoria (exame positivo no 10.° dia, negativo no 16.° e seguintes, até mais de 1 mês depois; a esplenectomia não provocou o reaparecimento dos tripanosomas).

Antes de serem inoculados estes animais, verificámos no material

injectado a presença de tripanosomas não alterados e perfeitamente mo veis. A infecção foi mortal no camondongo inoculado com tripanosomas do inséto e beningna no camondongo B, injectado com fórmas sanguicolas; deste fáto nada podemos deduzir, não só porque não foram inoculados animais testemunhos, como tambem não avaliámos a quantidade de parasitos injectados em cada camondongo.

2)— *Sôro da cobaia 4* (v. experiencias de reinoculações) foi submetido ao aquecimento a 45° durante 1/2 hora (sôro obtido na vespera e conservado na geladeira), em 4-VIII-33. Em dois tubos foram postas 10 gotas de sôro de cão com tripanosomas em pequeno numero (raça de cão 4.ª passagem) e sôro imune (40 e 20 gotas), sendo aquecidos a 37° durante 1 hora. O conteúdo de cada tubo foi injetado em 1 camondongo.

Camondongo C—(40 gotas de sôro imune + 20 gotas de sôro com tripanosoma)—Inoculação subcutanea em 4-III-33; exames negativos 1, 14 e 15-III-33 (morreu neste dia).

Camondongo D— (20 gotas de sôro imune + 10 gotas de sôro contaminado)—Inoculação subcutanea em 4-III-33; exame negativo em 12, positivo em 14-VIII-33. Nos dias 15 e 16 o exame foi negativo; positivo de 17 a 22. Morreu em 8-IX-33, tendo tido ainda varios exames positivos (25, 26, 28, 30-VIII) e negativos (23, 24, 29-VIII, 1, 4 e 8-IX-33).

Em resumo, o Camondongo C morreu sem ter tido tripanosomas no sangue 11 dias depois da inoculação; o camondongo D teve o 1° exame positivo 10 dias após, apresentando uma infecção sanguinea muito ligeira e irregular.

Em uma unica experiencia feita verificámos que o sôro de animal imune depois de ficar em contato 1 hora a 37° com fórmas B (sanguicolas) e fórmas U (metaciclicas) de *S. cruzi*, não proteje camondongos contra a infecção, quando com elas juntamente inoculado.

B. Borghi (1932) fez experiencias analogas com o *T. lewisi*, confirmando a ação protetora do sôro de ratos imunes e concluindo pela semelhança das propriedades antigenicas das fórmas B e das fórmas U deste tripanosoma.

Procurámos uma vez observar a ação de sôro imune sobre o desenvolvimento cultural do *S. cruzi*:

Semeando 2 tubos (meio de Noguchi) com a mesma quantidade de uma cultura de *S. cruzi* e adicionando a um deles (tubo 1) algumas gotas de sôro da cobaia 4, em 4-III-33, o desenvolvimento foi muito mais lento nesse tubo que no outro. No 1° dia encontravam-se critidias mortas e raras com movimento muito lento no tubo 1; no tubo 2, numerosos flagelados vivos com mobilidade normal. Com 48 horas o exame do tubo 1 foi negativo (1

preparado a fresco); no 5º dia havia raros flagelados. Ao fim de 13 dias a parte superior do tubo 2 apresentava-se turva, continuando limpido o tubo 1. até o 17º dia. Mais tarde observa-se macroscopicamente o desenvolvimento da cultura no tubo 1, muito menor do que o tubo testemunho. 5 mezes depois a turvação dos 2 tubos era igual; ao exame microscopico só foram vistos flagelados mortos. Foi verificado, assim, sensivel retardamento no desenvolvimento da cultura á qual foi adicionado sôro imune.

Pelos fatos que acabamos de expôr, vemos que a unica propriedade nitidamente demonstrada do sôro dos animais que sofreram a infecção pelo *S. cruzi* é a de desviar o complemento em presença de antigeno especifico (reação de Bordet-Gengou aplicada á tripanosomiase americana, conhecida por reação de Machado). O sôro de animais imunes não têm poder protetor, embora seja possivel que determine uma atenuação da infecção quando injetado depois de ter estado em contato com os tripanosomas; propriedades tripanoliticas ou tripanocidas, poder aglutinante ou de adesão, que apresentam comumente sôros de animais com outras tripanosomiases, não foram ainda observadas no sôro humano ou de animais infectados pelo *S. cruzi*.

Imunidade natural

Sobre a imunidade natural dos animais de sangue frio á infecção pelo *S. cruzi* publicámos uma nóta (1933) que transcreveremos, quasi sem modificações; depois diremos algumas palavras sobre a resistencia de certos animais heterotérmos á mesma infecção.

Em 1925 F. L. Niño diz ter verificado a sensibilidade de Batraquios (*Bufo marinus*) ao *S. cruzi*, mas seus resultados não foram confirmados pelos autores que depois estudaram a questão: Bruni (1926) não conseguiu infectar rãs e sapos (*Rana esculenta*, *Rana viridis*, *Bufo vulgaris*), observando-os por longo tempo, e Dios, Werngren e Perez (1929), repetindo em grande escala as experiencias de Niño, obtiveram sempre resultados negativos. Em suas pesquizas inocularam estes autores numerosos sapos (Bufo arenarum) com sangue de homem e de ratos brancos, e intestino de Triatomas, infectados pelo *S. cruzi*, controlando a negatividade dos resultados pela inoculação de sangue e orgãos dos sapos utilizados em ratos novos.

Brumpt (1927 b), verificando o ecleticismo alimentar dos Reduvideos transmissores do *S. cruzi*, sugere a possibilidade de serem os animais de sangue frio hospedadores naturais deste flagelado, não obstante reconhecer ao mesmo tempo a probabilidade de serem estes animais refratarios á infecção — o que aliás afirma, em outra parte (1927 a).

R. V. Tálice (1929) no Uruguay pesquizou o *Schizotrypanum* no sangue de animaes homeotermos, em zona onde havia exemplares infectados

de *Triatoma rubrovaria*, não o encontrando. A inoculação de lagartos (*Teius teyou*) não era seguida de infecção, pelo menos até 15 dias. Este autor tambem verificou no laboratorio a alimentação de triatomas sobre lagartos e rãs.

Em nossas experiencias inoculámos sangue de animais infectados em repteis (*Tropidurus torquatus, Ameiva surinamensis*) e batraquios (*Leptodactylus ocellatus, Bufo crucifer*).

Em 3 *Tropidurus*, inoculados sob a péle e intraperitonialmente com sangue de cobaia infectada (Raça de tatú), pudemos observar o desaparecimento dos tripanosomas e das hematias nas primeiras horas. 3 horas depois da inoculação o exsudato peritonial só continha flagelados vivos em 1 deles; em todos a fagocitose de hematias e tripanosomas era evidente. O exame do sangue destes lagartos foi negativo 3 e 24 horas depois de injetados. No 3º dia morreu 1 *Tropidurus*, sem parasitos no exsudato peritonial e no sangue; outro foi sacrificado no 7º dia com os mesmos resultados e sem fórmas de leishmanias nos musculos e tecido sub-cutaneo do ponto de inoculação. O terceiro morreu 12 dias depois, tambem com exame de sangue negativo.

Uma *Ameiva* foi inoculada com o mesmo material sob a pele e no peritonio; neste, pouco mais de 3 horas após a injecção, só vimos 1 tripanosoma preso a um leucocito, já havendo desaparecido os globulos vermelhos da cobaia. O sangue deste reptil teve exames negativos até 24 dias. Foi picado por uma femea de *Triatoma megista* que fizera sua ultima refeição 14 dias antes, e por larvas do mesmo inséto que nunca haviam sugado.

Quanto aos batraquios, quasi todas as nossas observações foram feitas sómente durante as primeiras horas que se seguiam á inoculação, até o desaparecimento dos tripanosomas da cavidade peritoneal, por fagocitose e por lise; apenas em 1 *Leptodactylus* foram feitos exames de sangue durante muitos dias. O ultimo exame, negativo, foi feito 35 dias após a inoculação.

Em resumo, os tripanosomas inoculados no peritonio de repteis (*Tropidurus*, *Ameiva*) e batraquios (*Bufo*, *Leptodactylus*) daí desaparecem em poucas horas por lise e fagocitose; a presença de flagelados no sangue destes animais não foi observada por exames feitos desde as primeiras horas até varios dias depois da inoculação do *Schizotrypanum*. E em conclusão, é extremamente improvevel que os animais de sangue frio possam ser reservatorios do *S. cruzi* na natureza, embóra tenha sido ainda uma vez constatada a capacidade do *Triatoma megista* sobre eles se alimentar.

—De um modo geral, os animais são mais sensiveis ao *S. cruzi* durante as primeiras idades. Principalmente em certos animais a sensibilidade é muito diversa no estado jovem e no estado adulto: os ratos adultos são, segundo Regendanz (1930), imunes a amostras de *S. cruzi* que, inoculadas em

ratos jovens, pódem produzir infecções mortais. Com o gato e o coelho o mesmo fato póde se dar.

E' provavel que a criança seja mais sensivel á infecção pelo *S. cruzi,* do que o homem adulto; entretanto, esta conclusão não póde ser baseada siimplesmente na observação de que os casos agudos da doença de Chagas são com muito mais frequencia encontrados nos individuos jovens. Não se póde fazer paralelo entre a infecção humana, contraída naturalmente, e a infecção experimental, em animais, por exemplo o rato, pois devem ser tomadas em consideração as condições de contagio, que em geral são satisfeitas desde as primeiras idades nas zonas de enfermidade endemica, como tambem as condições de relativa imunidade que se estabelecem no organismo infectado, nas quais se acham quasi todos os adultos habitantes das regiões de barbeiros.

Tendo-se em vista as condições a que nos referimos, não será razoavel atribuir-se a menor incidencia de infecções agudas nos individuos adultos á sua maior resistencia natural ao *Schizotripanum*. Segundo a opinião de M. Torres, como vimos, mesmo os doentes chronicos do mal de Chagas, que possuem um certo gráu de imunidade ao *S. cruzi*, não são insensiveis a reinoculações pelos barbeiros em condições naturais.

A imunidade natural de ratos adultos foi tambem por nós verificada, em experiencias feitas com raças de *Schizotrypanum* muito virulentas para outros animais:

2 ratos foram inoculados em 17-V-33, sob a pele, com sangue de saguí muito infectado (raça de cão, 2a. passagem, morto no 19º dia). Os exames de sangue foram negativos até 16-VI-33. Em ambos os ratos fizemos biópsias, retirando pequeno pedaço de tecido dos pontos de inoculação, 5 e 15 dias depois da injeção; só encontrámos leishmanias nos tecidos retirados no 5º dia.

1 rato adulto foi injetado em 27-V-33 com 5 c.c. de sangue de cão muito infectado (raça de cão, 2ª passagem). Os exames a fresco do seu sangue foram positivos durante os primeiros 5 dias, isto é, até 1-VI-33; do dia 2 em diante foi negativo, até 18-VII-33 (exames quasi diarios). Este rato teve sómente a fase sanguinea inicial da infecção; os tripanosomas que se encontraram no sangue peripherico até o 5º dia foram os inoculados.

2 ratos brancos não se infectaram por deposição de excreções hialinas de barbeiros sobre a péle, como tambem 1 que devorou um triatoma.

Alguns autores tem obtido infecções ás vezes bastante intensas e mesmo mortais em ratos adultos; a maioria entretanto reconhece a pouca sensibilidade dos ratos adultos á infecção pelo *S. cruzi*.

III) — **Schizotrypanum cruzi no organismo do Invertebrado:**

Sumário: — A) — *Triatoma megista*: material e técnica; anatomia do aparelho digestivo. Cíclo evolutivo: considerações gerais; fáse estomacal, bacterioides; fáse intestinal ou duodenal; fáse retal; tubos de Malpighi, glandulas salivares e cavidade geral. Dejeções: caractéres, condições de eliminação, origem; fórmas parasitarias e sua significação. Infectividade das fórmas evolutivas do tubo intestinal.

B) — *Cimex lectularius*: anatomia; evolução, infectividade e transmissibilidade do *Schizotrypanum*.

C) — Transmissão entre Invertebrados: hereditariedade, canibalismo, coprofagia; considerações gerais.

A) — *Triatoma megista*

Material e tecnica.

O material de que temos nos servido para estudo do ciclo evolutivo do *S. cruzi* e para outras pesquizas é proveniente de Lassance, constando em grande parte do *Triatoma megista* Burm., o principal transmissôr da doença de Chagas naquela região.

Os insétos colhidos nas cafúas são em alta percentagem portadores do parasito (Chagas), principalmente durante os ultimos estádios de sua evolução; trazidos ao laboratorio, servem como fonte de virus para as infecções experimentais e são empregados em estudos parasitologicos, experiencias de transmissão, etc. A partir dos ovos dos barbeiros infectados ou não obtem-se uma criação de insétos puros que assim se conservam por alimentação em animais normais, sendo estes insétos utilizados principalmente para estudo do ciclo evolutivo do tripanosoma e para experiencias de infectividade.

Dissecção: As grandes dimensões do *T. megista* nas ultimas fases de sua evolução muito facilitam o isolamento de seus orgãos internos, especialmente do tubo digestivo e anexos.

Para se isolar e distender o tubo intestinal prestam-se melhor os insétos com o estomago vasío ou com pouco sangue, depois de decorridos alguns dias desde a ultima refeição. Para isto, pode-se proceder da seguinte maneira:

1) Fixando o inséto por meio de uma pinça, cortar com tesoura as pernas, as asas e as partes laterais do abdomen (conexivo);

2) Abrir a cavidade abdominal por uma secção transversa praticada com tesoura na folha quitinosa dorsal, junto ao tórax;

3) Fixar o hemiptero numa placa de Petri contendo parafina solida, espetando-se um alfinete na casca ventral do abdomen, de dentro para fóra, tendo-se o cuidado de não ferir o intestino; a folha dorsal do abdomen deve ser levantada, dobrada para trás e fixada á parafina por outro alfinete, de modo que a cavidade abdominal fica quasi inteiramente aberta pela face dorsal.

4) Abrir com uma pequena tesoura as partes laterais do tórax, introduzindo uma das laminas na massa muscular e cortando cuidadosamente até separar completamente o resto do exoesqueleto dorsal; ficarão então expostos todos os orgãos internos do barbeiro.

5) Retirar com pinça e tesoura as partes moles toraxicas e abdominais que não interessem (musculos, tecido adiposo, orgãos genitais, vaso dorsal, traquéas...); dissecar o mais possivel até ás proximidades do orificio anal, com cuidado para não romper a empôla retal, (fig. 8).

6) Desfazer a articulação da cabeça com o tórax sem seccionar o esofago; separar das porções quitinosas vizinhas o ultimo segmento abdominal.

7) Transportar para uma lamina com algumas gotas de agua fisiologica o tubo intestinal, segurando-o pelas suas porções quitinosas terminais e distende-lo com o auxilio de agulhas e pinças histológicas, rompendo as aderencias mantidas pelos filamentos traqueais e tubos de Malpighi entre suas diversas partes.

Por esta técnica as diferentes partes do tubo digestivo ficam perfeitamente separadas, podendo-se fazer esfregaços ou córtes de cada uma isoladamente.

A fixação dos orgãos internos póde tambem ser feita *in loco,* imergindo-se o inséto aberto no liquido fixador; a dissecção é terminada depois de fixado. Este processo convem quando o barbeiro está com o estomago ou o réto muito dilatados pelo seu conteúdo, caso em que a rutúra das paredes se dá facilmente quando se pratíca a dissecção a fresco em sôro fisiologico. Para se retirar os fragmentos de quitina que quasi sempre ficam aderentes á ultima porção do réto convem tambem esperar que a peça esteja fixada, principalmente si a empôla rétal estiver distendida por dejeções.

Para se retirar as glandulas salivares o meio mais prático é fazer-se a dissecção como foi dito, tendo-se cuidado especial na abertura do tórax. Depois de bem isolado o tubo intestinal e rompida a parte superior do anel quitinoso por onde o intestino penétra na cavidade torácica, faz-se uma ligeira tração para cima e para traz, segurando-se a cabeça do inséto com uma pinça; as glandulas salivares ficam aderentes ao

esôfago e á primeira porção do intestino médio. Barros Barreto aconselha para esse fim que se deixe o barbeiro decapitado para ser dissecado no dia seguinte; a secreção acumula-se nas glandulas, aumentando-as e facilitando a dissecção.

As dissecção das fórmas jovens dos triatomas (larvas) é menos facil, não podendo ser feita com a mesma precisão. Quando se trata de larvas já de certo tamanho é possivel a separação perfeita das partes principais do tubo digestivo, procedendo-se desta maneira: segurando-se o inséto pela cabeça e pelo tórax, com uma pinça curva, cortam-se as pernas e os bordos do exo-esqueleto (na junção das folhas quitinosas dorsal e ventral); depois de retirada toda a lamina dorsal, com uma agulha puxa-se o estomago para cima de uma lamina e secciona-se o tubo intestinal ao nivel do estrangulamento que separa o estomago da segundo porção do intestino médio; com esta porção faz-se o mesmo, seccionando-se junto á inserção dos tubos de Malpighi; antes de se puxar tambem o réto para a lamina deve-se lavar com agua fisiologica o interior da carcassa do inséto, para se retirar os detrítos de outras partes do intestino. Por este modo obtem-se numa mesma lamina, onde se colocam préviamentre tres gotas de sôro fisiologico ou outro liquido apropriado (liquido de Laveran e Mesnil, etc.) material das duas porções do intestino médio e o intestino posterior de larvas, para exame a fresco ou para coloração.

— Para o estudo do ciclo evolutivo do tripanosoma é recomendavel que se façam, juntamente com córtes seriados, esfregaços das diversas porções do tubo intestinal de insétos com o mesmo tempo de infecção. O exame a fresco emprega-se para a verificação da infecção e de sua intensidade, observação da disposição e mobilidade dos parasitos, bem com para a pesquiza de flagelados em certos orgãos (tubos de Malpighi, glandulas salivares), etc. O exame dos córtes e dos esfregaços corados completam-se, pois os primeiros esclarecem sobretudo a disposição geral e a localisação dos parasitos, e os segundos sua morfologia nas diferentes regiões do condúto intestinal. As diversas fases da evolução, por estes meios, pódem ser perfeitamente acompanhadas.

Temos empregado varios agentes fixadores para o estudo histologico e parasitologico dos orgãos dos barbeiro: sublimado alcool de Schaudinn e de Mayer, sublimado acético, alcool absoluto, liquidos de Zenker, Helly, Carnoy, Gielson, Bouin e Duboscq-Brasil. As melhores fixações que obtivemos foram pelo Carnoy, o qual muito se presta para as colorações pelo Giemsa e pela hematoxilina férrica. Os liquidos de Zenker e de Helly tambem dão bôas fixações, adequadas principalmente ao etudo histologico do inséto pelas colorações pela hematoxilina-eosina; o método de Giemsa poderá ser empregado, mas não dá a reação tipica e a diferenciação

nunca é perfeita, para os tecidos e para os parasitos ao mesmo tempo. Os liquidos de base de sublimado dão resultados inconstantes e poucas vezes satisfatórios.

Após inclusão em parafina os orgãos são cortados em série, geralmente com a espessura de 5 ou 6 micra, e corados pelo métodos de Giemsa e de Heidenhain. A dupla coloração pela hematoxilina-eosina é suficiente para o estudo da anatomia microscopica e a observação da disposição dos flagelados nas diversas porções do aparelho digestivo. Para a inclusão em parafina costumamos usar como liquido intermédiario, nos casos em que o estomago está cheio de sangue, a essencia de cravo da India; ao saír do alcool absoluto depois de desidratadas, as peças são levadas a este líquido, onde permanecem dois ou mais dias, passando depois á parafina (o excesso de essencia deve ser retirado das peças por imersão em xilol durante pouco tempo).

Esta técnica foi a unica que nos permitiu obter córtes seriados de estomago de triatomas pouco tempo depois da refeição[3]. Nos casos casos comuns o xilol e o cloroformio dão bons resultados. Tentámos algumas vezes fazer córtes de barbeiros inteiros, o que não conseguimos satisfatóriamente; o exoesqueleto dos triatomas oferece grande resistencia á secção depois de submetido á fixação, mesmo o dos insétos fixados poucas horas depois ou durante uma ecdise.

— Dados gerais sobre a anatomia macroscopica e microscopica e sobre as funções das diversas partes do tubo digestivo e orgãos anéxos do *Triatoma megista.*

O canal alimentar dos triatomas, como o de todos os insétos, divide-se em tres porções, no caso nitidamente individualizadas: o intestino anterior, o intestino médio e o intestino posterior (fig. 7).

O intestino anterior, pre-intestino ou stomodéum, é composto por tres segmentos, o rostro ou probócida, o faringe e o esôfago. «O rostro contem no seu interior duas mandibulas e duas maxílas. O faringe está no interior da cabeça do inséto em seguimento ao canal de sucção, sob a fórma de um tubo de paredes fortemente quitinizadas» (Cezar Pinto). O esôfago é um tubo curto, de pequeno diametro, que faz continuação ao faringe.

Ao esôfago, ultima porção do stomodéum, segue-se imediatamente o intestino médio, não havendo a interposição de um proventriculo diferenciado.

O stomodéum é revestido internamente por uma lamina quitinosa; é uma invaginação do ectoderma da cabeça. O revestimento quitinoso re-

[3] O emprego da essencia de cravo foi-nos aconselhado pelo Snr. A. Lopes, técnico de Anatomia Patológica do Instituto Oswaldo Cruz.

cobre-o em toda sua extensão, não se prolongando além do orificio cardiacc No barbeiro não existe a formação denominada « Russel » (A. Schneider) pelos autores alemães. No intestino anterior a disposição das camadas musculares é inversa da dos outros compartimentos digestivos: a tunica muscular externa é constituida por fibras circulares e a interna por fibras longitudinais.

As diversas partes componentes do stomodéum são adaptadas á sucção e á condução do sangue ao estomago. Como já indicámos, não ha no intestino anterior orgão destinado a armasenar o alimento (proventriculo).

— O intestino médio, mesênteron, é a porção mais desenvolvida do aparelho digestivo do Triatoma. Limitada anteriorminete pelo cárdia e posteriormente pela inserção dos tubos de Malpighi, consta de duas porções muito distintas: a anterior. denominada habitulamente estomago, é uma grande dilatação ampular: a posterior, constituida por um tubo longo e delgado, é a chamada porção tubular ou intestinifórme do mesênteron.

O estomago, tambem chamado intestino quilifico e impropriamente « proventriculo », é um compartimento destinado a receber e armasenar o sangue ingerido pelo hemíptero; quando repleto, ocupa quasi toda a cavidade abdominal e quando vasio, após prolongado jejum, torna-se alongado e murcho, encerrando bôlhas de gaz. Nelle se passam os fenomenos de digestão.

A porção intestinifórme ou duodeno apresenta-se sempre irregularmente enovelada na cavidade abdominal e cheia de materia escura, produto da digestão hematica. É de diametro irregular, muito variavel segundo o estado de digestão, havendo geralmente na extremidade posterior uma dilatação mais ou menos acentuada pelo acumulo de detritos digestivos. Constitue a zona de absorpção do aparelho digestivo.

Histologicamente o mesênteron é formado pelas duas camadas fundamentaes do condúto intestinal, que são epitélio e a pleura. O epitélio é simples, estendendo-se continuamente desde o cárdia ao piloro; constituido por celulas de dimensões variaveis, maiores no duodeno que no estomago, assestadas sobre uma intima anísta, este epitélio não apresenta planura estriada ou cilios. A camada muscular é formada por fibras que se dispõem em feixes descontinuos, situados externamente no sentido longitudinal e internamente no sentido transversal. Não existe membrana peritófica no barbeiro; o conteúdo intestinal fica em contáto dirétamente com as paredes do tubo digestivo.

Do ponto de vista da distribuição e da disposição dos parasitos nesta parte do canal intestinal, os detalhes de sua estrutura histologica não têm interesse.

O intestino posterior, proctodéum ou post-intestino, acha-se nos Triatomídeos reduzido á empôla rétal. É uma dilatação aproximadamente ovoide, de pequenas dimensões, limitada adiante pela inserção dos tubos excretores e atrás pelo orificio anal.

Sua fórma varía tambem com o estado de repleção; quando cheio, como por exemplo pouco tempo depois da refeição, mostra-se dilatado, esférico, e vasío torna-se alongado, pirifórme.

A côr do réto é variavel segundo a qualidade das excreções nele acumuladas, sendo escura quando no seu interior ha féses, e amarela ou branca segundo encerre urina granulosa ou hialina. Nos Hemipteros não existe o cécum rétal que alguns insétos possuem e que tem sido descrito no barbeiro, por confusão talvez com as empôlas terminaes dos tubos de Malpighi.

O conhecimento da estrutura histologica da empôla retal tem grande importancia para o estudo da evolução do *Schizotrypanum* durante as ultimas fases do ciclo, que nela se passam.

A parede do intestino posterior é forrada internamente por duas camadas muito distintas de tecido, que se reconhecem facilmente ao exame de córtes longitudinais praticados em empôlas retais em distenção natural pelas dejeções. Na primeira porção do réto, em contacto com a região pilorica, a empôla retal é revestida por um epitélio alto, de nitida planura estriada; a porção terminal é recoberta por uma superficie quitinosa irregular que faz continuação ao epitélio e se prolonga até o anus.

Em todos os insétos a ultima porção do protodéum é revestida, bem como o stomodéum, por quitina resultante da invaginação do exoesqueleto.

A tunica muscular é bem desenvolvida ao nivel do réto. Sua conformação, analoga á do estomago, póde ser bem estudada em preparações totais em que o orgão é fixado e corado depois de aberto e distendido. Como no estomago, as fibras estriadas dispõem-se em feixes separados formando uma rêde; os feixes externos são longitudinais e os internos transversais.

A estrutura das paredes do réto permite-lhe grande extensibilidade e grande contratilidade. Quando se abre o inséto pouco depois de uma refeição encontra-se frequentemente a empôla retal muito dilatada por dejeções que nela se acumulam (fig. 9); por longo tempo o réto conserva seu intenso peristaltismo nos barbeiros abertos, embebidos em agua fisiologica.

O proctodéum desempenha a função de acumular e eliminar os produtos excrementicios.

As dimensões das diversas partes do intestino (estomago, proctodéum)

naturalmente variam muito segundo seu estado de repleção. Nos individuos adultos, cujo comprimento total é de 33 a 37 mm. (tomado com a probócida distendida), as dimensões das diversas partes do intestino oscilam em geral entre os seguintes limites:

Intestino anterior:	9-12 mm.
Estomago	10-20 mm.
Duodeno	20-40 mm.
Intestino posterior	4- 6 mm.

A porção do tubo digestivo de dimensões mais variaveis é o duodeno (porção tubular do mesenteron) e estas variações não são determinadas pelo conteudo intestinal. O comprimento desta parte do intestino, nas imagens, não raro atinge mais de 40 mm.

Os orgãos anexos ao tubo digestivo que nos interessam são as glandulas salivares e os tubos de Malpighi.

As glandulas salivares existem em numero de 6 no barbeiro, dispostas simetricamente de cada lado do tubo intestinal. A anatomia e a histologia do aparelho salivar do *T. megista* foram estudadas por B. Barreto (1922) e seus principais dados a respeito serão aqui sumariados.

Em cada metade do inséto distinguem-se 3 glandulas dispostas da seguinte maneira, de diante para trás: duas glandulas unidas, situadas ao nivel da porção inicial do estomago, que são as glandulas principal e suplementar, e uma posterior, isolada, aderente á parede do estomago, a glandula accessória.

A glandula principal possue uma coloração amarelo-escuro, é reniforme e, como seu nome indica, constitue o mais importante orgão produtor de saliva. As glandulas suplementar e acessoria são consideradas simples reservatorios da secreção excessiva do elemento principal, unico que possue estrutura glandular. Do par de glandulas anterior emergem dois condutos excretores, um deles unindo-o á glandula acessoria e outro indo ter a um orgão mediano situado no segmento cefalico, orgão este que tem a função de aspirar a saliva pelo canal salivar formado pelas duas mandibulas.

Os tubos de Malpighi, em numero de 4, são longos e delgados e dispõem-se irregularmente enrolados na cavidade abdominal em torno do tubo intestinal, com o qual têm aderencias por meio de ramos traqueáis. A inserção dos tubos excretores no conduto intestinal marca externamente o limite entre o mesênteron e o proctodéum. Os tubos de Malpighi formam na sua embocadura uma pequena dilatação através da qual as excreções passam ao intestino posterior. Ha duas dilatações dorsais e duas ventrais que se abrem imediatamente atrás do orificio pilorico; são as empôlas terminais

dos tubos de Malpighi, orgãos para os quais anteriormente chamámos a atenção (1930) como séde de localização frequente dos parasitos. Externamente estas empôlas são individualizadas; pela sua fusão, dão origem a uma cavidade interna situada entre o réto e o piloro, por onde vão ter ao protodéum as excreções malpighianas e as féses. Esta cavidade ou «atrium» comunica-se com o réto por um orificio valvular formado por uma lamina epitelial que deriva dos tubos excretores e que, do lado do réto, é forrada pelas celulas epiteliais de planura estriada, que descrevemos. Conforme o estado de distenção da empôla retal, este atrium fica em comunicação mais ou menos franca com a mesma. As figuras que apresentamos esclarecem melhor a constituição e as relações das porções terminais dos orgãos excretores com o intestino posterior (Estampa 6 e 8).

As empôlas terminais dos tubos de Malpighi existem tambem no *Cimex*. Packard (1909) assim se refere a elas: «Em muitos insétos (*Cimex*...) os vasos se abrem em uma espécie de bexiga urinaria em conexão com o intestino». Em outros Hemipteros (*Pyrrhocoridae, Asopinae, Pentatominae, Alidinae*...) apresentam-se tambem bastantes desenvolvidas (vêr as estampas de Kuskop, 1923).

Os tubos de Malpighi são constituidos essencialmente por um sincício epitélial secretor provido de uma camada ciliar ou de planura estriada; sobre as diversas interpretações da estrutura estriada deste epitélio, ver por exemplo Noël e Tahir (1929). Sobre os caractéres da excreção malpighiana ou urinaria daremos adiante algumas informações.

—Pelo que acabamos de expôr sobre a conformação geral do aparelho digestivo, vê-se que este apresenta todas as particularidades anatomicas comuns aos Hemipteros, que são: ausencia de proventriculo, grande extensão do intestino médio, intestino posterior reduzido á empôla retal e baixa inserção dos tubos de Malpighi.

Nos Hemipteros a ausencia de proventriculo é compensada pelo grande desenvolvimento do mesenteron que, dividido em duas porções, serve como reservatorio de alimento, camara digestiva e zona de absorção.

A anatomia do tubo intestinal do *T. megista* é muito semelhante á dos *Cimex* (ver Patton e Evans, 1929).

Ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*

Considerações gerais

Segundo Chagas o *S. cruzi*, microorganismo dotado de diferenciação sexual, sofre no *T. megista*, em certas circumstancias, um duplo ciclo evolutivo, um sexuado e outro assexuado. O ciclo sexuado realiza-se na porção anterior do intestino médio, inconstantemente, quando coexistem no sangue

ingerido os elementos sexualmente diferenciados; o fenomeno da fecundação aí se passa entre a fórma macho, delgada e de rapido movimento, e a fórma femea, larga, de movimento lento.

O elemento resultante da fusão destas fórmas sofre uma série de transformações, de que resultam tripanosomas que vão se localizar nas glandulas salivares e são transmitidos pela picada.

O ciclo assexuado ocorre constantemente nos barbeiros que sugam animais infectados, tendo como resultado final o aparecimento das fórmas de tripanosoma no intestino posterior.

A existencia de fenomenos sexuais em varios Tripanosomidas, durante o ciclo no invertebrado transmissôr, tem sido admitida por diversos autores; entretanto a maioria, atualmente, não mais admite a ocorrencia de tais fenomenos. Em realidade, porém, o problema ha muito tempo está no mesmo pé, porque, si ainda hoje podemos repetir que «there is at present no sound evidence of conjugation in any trypanosome life-cycle so far worked out» (Miss Robertson, 1912), com mais rigor devemos acrescentar que «at the present time it is not possible either to affirm or to deny, with certainty, that sexual processes occur» (Minchin e Thomson, 1915, p. 604).

Pouco depois dos primeiros estudos de Chagas sobre o parasito que descobrira, apareceram os trabalhos de E. Brumpt, em que a evolução do *Schizotrypanum* foi estudada em diversos artrópodes e comparada á de outros flagelados.

Devido principalmente ás pesquisas de Brumpt, que descobriu as fórmas «metaciclicas» e verificou a transmissibilidade da infecção pelas féses do *T. megista,* o *S. cruzi* é considerado atualmente como pertencente ao grupo dos Trypanosomidas que evoluem na porção posterior do Invertebrado e são transmitidos pelo método contaminativo (vêr Wenyon, 1926). A demonstração da existencia de uma evolução na porção anterior do *Triatoma* (Chagas) colocaria o *S. cruzi* num grupo intermediario na classificação de Wenyon, de que seria presentemente o unico representante, como flagelado possuindo as duas modalidades de evolução (*anterior e posterior station*) e as duas possibilidades de transmissão (inoculativa e contaminativa).

O ciclo evolutivo do *S. cruzi,* que tem como resultado final o aparecimento das fórmas propagativas no intestino posterior e cujos principais aspétos morfologicos são conhecidos pelos trabalhos de Chagas e Brumpt, será por nós acompanhado em suas linhas gerais.

O desenvolvimento do *S. cruzi* no inséto transmissôr passa-se no tubo digestivo, realizando-se suas diversas fáses no intestino médio e no intestino posterior. As regiões do tubo intestinal em que se sucédem os fenomenos de evolução permitem devidi-la naturalmente em 3 fáses bastantes

carateristicas. Assim, as primeiras alterações sofridas pelos tripanosomas ingeridos na primeira porção do intestino médio constituem a *fase estomacal*; ainda no mesenteron, na sua parte tubular, realiza-se outra fáse de evolução a que poder-se-á chamar *fáse intestinal* ou *duodenal*; finalmente o intestino posterior é séde das ultimas transformações evolutivas, cujo conjunto constitue a *fáse retal*, de que resultam as fórmas finais do desenvolvimento no Invertebrado.

O ciclo evolutivo do *S. cruzi* realiza-se por transformações morfologicas irreversiveis através o conduto digestivo. Do ponto de vista da interpretação dos fenomenos gerais de evolução, póde-se dizer que o ciclo deste protozoario consta de tres periodos ou fáses fundamentais: o periodo de regressão ao «tipo ancestral» (Minchin), o periodo de multiplicação e o periodo de evolução propriamente dita ou transformação em fórmas metaciclicas, fáses ou periodos estes que correspondem essencialmente, embora não estritamente, ás fáses estomacal, intestinal e retal, respectivamente.

A' exceção dos tubos de Malpighi, que ocasionalmente pódem ser invadidos por parasitos, os flagelados ficam confinados ao tubo intestinal durante todo seu desenvolvimento no inséto; a presença de fórmas de evolução do *S. cruzi* na cavidade geral e nas glandulas salivares, de que adiante trataremos, nunca foi por nós observada em condições naturais, no *T. megista*.

Durante a fáse estomacal as transformações evolutivas iniciais são pouco acentuadas e não se processam ao mesmo tempo e do mesmo modo em todos os tripanosomas sanguicolas ingeridos. Emquanto que em alguns inicia-se a migração do blefaroplasto para a parte anterior do flagelado, outros poderão sofrer alterações degenerativas ou permanecer inalterados. A intensidade dos fenomenos evolutivos e degenerativos é muito variavel, segundo condições indeterminadas; no estomago ambos os fenomenos ocorrem normalmente, podendo uns predominar sobre os outros.

Praticamente em 100 % dos barbeiros (*T. megista*) que sugam um animal infectado, estabelece-se um parasitismo duradouro, segundo as experiencias de Chagas, Brumpt e tambem as nossas. Este fato indica que os fenomenos degenerativos, que parecem constantemente ocorrer, nunca são tão generalizados a ponto de atingir a todos os tripanosomas ingeridos e impedir o estabelecimento da infecção no hematófago.

No caso do desenvolvimento do *S. cruzi* no *T. megista* não ha necessidade de se distinguirem duas séries, uma evolutiva e outra degenerativa, porquanto as alterações degenerativas parecem se dar em condições normais sómente no estomago ao mesmo tempo que as transformações evolutivas que aí se passam são relativamente de pouca importancia; aliás, seria im-

possivel distinguir na massa sanguinea em digestão os tripanosomas alterados que seguiriam sua evolução normal, ou seriam destruidos.

Passando á porção intestiniforme do mesenteron, em pouco tempo os parasitos transformam-se em critídias que se multiplicam ativamente, geralmente por divisão binaria. A fáse intestinal é um periodo de multiplicação e crescimento, caracterizado por individuos critidiomorficos de dimensões muito variadas, geralmente grandes.

No intestino posterior, critidias de tipo menor aderem á superficie epitelial ou se insinuam entre as dobras quitinosas, continuando a se multiplicar e transformando-se em fórmas de blefaroplasto posterior, metaciclicas.

As fórmas parasitarias do intestino posterior e do intestino médio (porção tubular) constituem um «stock» de parasitos que mantém por tempo indefinido a infecção no inséto, sem que seja necessaria nova refeição infectante.

A quantidade de parasitos no tubo digestivo do inséto sofre variações devido a condições imprecisas, provavelmente tambem á frequencia da alimentação. O jejum prolongado do hematofago exerce influencia nefasta sobre a vitalidade dos parasitos: quando se examina a fresco o conteúdo intestinal de barbeiros nessas circumstancias, encontram-se muitos flagelados imóveis ou com mobilidade muito diminuida.

O *T. megista* na fáse adulta repete a sucção de sangue com o intervalo de 15 dias mais ou menos, emitindo dejeções durante ou pouco tempo depois da mesma (Neiva, 1910).

A duração do desenvolvimento do *S. cruzi*, desde a ingestão das fórmas sanguicolas até o aparecimento dos primeiros tripanosomas metaciclicos, está sujeita a variações, entre as quais as devidas ao estado de evolução do inséto. Nas fórmas jovens do *T. megista* os metaciclicos começam a se formar em geral no 6º ou 7º dias; nos individuos em fáse ninfal ou alada, sobre os quais não possuimos a este respeito senão muito poucas observações, o ciclo evolutivo deverá se completar entre 10 e 15 dias depois da contaminação.

Os barbeiros que se infectam sugando animal doente mesmo uma unica vez, alimentando-se subsequentemente em animais normais, permanecem parasitados em geral o resto da vida (Chagas).

Considerando as relações existentes entre a frequencia das refeições do inséto e o tempo de duração da evolução ciclica do parasito; a eliminação de grande quantidade de tripanosomas infectantes pelas dejeções emitidas depois de cada repasto; a percentagem dos barbeiros que se infectam por uma unica refeição contaminante e a persistencia da sua infecção,—ve-

mos que ha perfeita adaptação entre o *S. cruzi*, como protozoario de « evolução posterior » e de transmissão por contaminação, e o *T. megista*, como seu hospedador e vectôr natural mais importante.

Fáse estomacal

Poucas horas depois de ingeridos com o sangue de um animal infectado começam os tripanosomas a sofrer as primeiras alterações morfologicas na porção sacular do intestino médio.

Estas alterações são muito variaveis, dando aspétos morfologicos bastantes diversos aos parasitos. Nos primeiros dias após a refeição infectante encontram-se no estomago flagelados dos seguintes tipos: 1) fórmas sanguicolas não modificadas ou ligeiramente alteradas; 2) tripanosomas em transição para a fórma de critidia; 3) critidias; 4) fórmas arredondadas, com ou sem flagelo livre; 5) parasitos irregulares com sinais mais ou menos acentuados de degeneração.

Desde algumas horas depois de estarem no estomago os tripanosomas sanguicolas perdem sua mobilidade caracteristica, mesmo antes que tenham sofrido modificações morfologicas, devido possivelmente a diferenças de tensão osmótica.

A parte essencial da evolução no estomago é a transformação dos parasitos sanguicolas em critídias, que correspondem segundo a expressão de Minchin á fórma larvaria ancestral dos hemoflagelados. Em grande numero dos tripanosomas ingeridos esta transformação apenas se inicia no estomago, completando-se depois de sua chegada á segunda porção do intestino médio.

A fáse estomacal é uma fáse de «regressão» essencialmente, que precede a fáse de multiplicação. As divisões que sofrem alguns parasitos no estomago não têm praticamente importancia como fatôr de multiplicação, de que resultaria grande aumento numérico dos flagelados no inséto.

No estomago do *T. megista* encontram-se raramente fórmas sanguicolas com dois nucleos e dois blefaroplastos, alterações estas que parecem traduzir antes um fenomeno degenerativo que uma divisão binaria normal. Estas fórmas anomalas parecem ocorrer tambem no estomago do *Ornithodorus moubata*, a julgar pela figura 51 da estampa 8 do trabalho de Mayer e R. Lima (1914).

Os tripanosomas sanguicolas pódem passar diretamente á fórma de critidia, ou transformar-se em organismos arredondados, *leishmanias*. Segundo Minchin (1914) o estadio de leishmania, que ocorre por derivação diréta das fórmas do sangue, constitue a fáse «inconstante e variavel» do ciclo do *S. cruzi*.

Durante os primeiros dias encontram-se com facilidade fórmas do sangue que não sofreram transformações evolutivas nem degenerativas. Fórmas de blefaroplasto posterior, embora sem flagelo e de contornos irregulares pódem ser encontrados até muitos dias depois da refeição (figs. 9-10, estampa 11, 21 dias).

No estomago permanecem durante mêses parasitos arredondados, aflagelados, leishmaniformes, ainda depois que o inséto foi alimentado em animais normais depois de um repasto infectante. Estes parasitos pódem ficar vivos, como em latencia, sem se multiplicar e sem evoluirem, pelo menos no estomago, em numero diminuto; a presença de grandes massas de leishmanias, que Brumpt referiu ter achado no ventriculo quilifico de um *T. megista* adulto, nunca foi por nós observada.

Parece haver uma relação entre a intensidade dos fenomenos degenerativos sofridos pelos tripanosomas no estomago e a rapidez e intensidade dos processos digestivos. Para as diferentes idades do inséto e para cada individuo, podemos julgar da intensidade e da velocidade dos fenomenos digestivos pela rapidez com que se dá a lise dos globulos vermelhos depois da refeição. Segundo seja maior a idade do inséto, a hemolise vae se tornando mais rapida: no estomago das larvas é frequente encontrar-se até o 5º dia hematias inteiras, ao passo que nos adultos já são dificeis de encontrar depois do 3º. Durante qualquer fáse da evolução do inséto a velocidade da digestão, apreciada pela hemolise, é variavel para cada individuo.

Assim, num lóte de hemipteros alimentados conjuntamente no mesmo animal infectado, e sacrificados ao fim do mesmo prazo, o aspéto microscopico do conteúdo estomacal póde ser muito diverso, tanto quanto ao estado do sangue ingerido, como quanto ao numero e morfológia dos parasitos. De um modo geral a destruição total das hematias se dá entre 2 e 5 dias após a sucção; casos ha entretanto, e frequentes, em que não se vêem mais hematias intactas no estomago mesmo antes de 24 horas.

Nos insétos em que a hemolise é mais rapida a degeneração e lise dos tripanosomas é mais geral; a relação entre hemólise e tripanólise tem sido notada sob a influencia de agentes diversos, como bile, saponina, veneno de cobra etc. No *T. megista,* os fenomenos paralelos de hemólise e tripanólise parecem ser muito influenciaveis pelo desenvolvimento da flóra microbiana no conteúdo sanguineo do estomago; de fato, nos casos em que estes fenomenos são precoces e intensos, a ponto de serem dificilmente encontraveis os tripanosomas ingeridos ás vêses em grande numero e que foram destruidos em massa, observa-se quasi sempre enorme quantidade

de cócus e bacilos na massa em digestão, os quais provavelmente por meio de fermentos resultantes de seu metabolismo exerceram sua acção litica.

—Na região anterior do estomago, proximo ao esôfago, temos algumas vezes encontrado em córtes de *T. megista* adultos, celulas epitéliáis do revestimento gastrico, sem caractéres especiais, encerrando no seu protoplasma ou em vacuolos elementos esféricos ou baciliformes semelhantes a outros que se encontram na luz do orgão ou aderentes á sua superficie interna. Nos esfregaços de tubo intestinal de barbeiros é muito frequente achar-se celulas mononucleadas, arredondadas, pequenas ou grandes, ás vezes repletas de bastonêtes longos e delgados.

—No tubo digestivo e em outros orgãos de numerosos insétos tem sido encontrados microorganismos de natureza ainda obscura; tem sido verificados com grande constancia nos hematofagos, especialmente naqueles que durante toda sua evolução exercem exclusivamente o regime alimentar sanguineo. Muitos autores, reconhecendo a grande constancia destes « bacterioides » ou « rickettsias » no condúto digestivo dos insétos e sua transmissão hereditaria em alguns casos, atribuem a esses microorganismos um papel importante na economia dos hospedador, pela sua intervenção nos processos de digestão: por isso são tambem designados por « simbiontes ». Para Roubaud, nos insétos que têm regimen alimentar exclusivamente hematofago, os bacterioides são mesmo indispensaveis á digestão normal (hematofagia simbiótica)[4]. Como o *T. megista* desde as primeiras idades se alimenta normalmente de sangue, não será de surpreender que futuramente seja comprovada a natureza simbiótica dos germens intracelulares que vimos na região anterior do tubo intestinal deste inséto. Estes germens não tem nenhuma relação com os «micetomas» portadores de bacterias encontrados no *Cimex* (Buchner, 1921), nem com os « cordons valvuleux » (Dufour, 1833), existentes em numerosos Hemipteros não hematofagos e tambem séde de localizações microbianas; estes «Bakterienorganen» presentes em certos Heteropteros (Kuskop, 1924) não existem no barbeiro.

—No estomago de insétos sacrificados a tempos muito variados depois de sugarem animais infétados, não encontrámos evidencia de fenomenos sexuais entre os tripanosomas, nem aspétos parasitarios que pudessem ser interpretados como resultantes destes fenomenos. As unicas fórmas de blefaroplasto posterior que encontrámos no intestino médio são as proprias fórmas sanguicolas, que ficam no estomago sem evoluir, mais

[4] Vejam-se Roubaud (1919), Buchner (1921), Wigglesworth (1929)...

ou menos conservadas, até muitos dias, e no duodeno, durante menos tempo. Em 1927 Chagas descreveu no intestino médio do *T. megista* tripanosomas finos, distintos dos tripanosomas metaciclicos, que seriam responsaveis pela infestação das glandulas salivares.

—No interior de celulas da parede do intestino médio nunca vimos fórmas de evolução do *S. cruzi*. O ciclo evolutivo deste parasito passa-se todo na luz do intestino.

Fáse intestinal

Os flagelados que passam para a porção intestinifórme do mesênteron durante os primeiros dias depois do repasto infetante têm a morfologia de tripanosoma e de critídia, ou são fórmas intermediarias, em transição (est. 11).

Nesta porção do tubo digestivo os tripanosomas sanguicolas pódem ser encontrados até alguns dias depois de ingeridos (5,6), seja por emigrarem tardiamente do estomago, ou seja, menos provavelmente, por já aí se acharem sem evoluir desde as primeiras horas.

24 horas depois da ingestão dos tripanosomas encontram-se no duodeno flagelados já com morfologia de critídia, os quaes são numerosos ao fim de 2 a 3 dias; a este tempo os parasitos estão em franca proliferação.

A fase intestinal é catacterisada por parasitos critídio-morficos e representa um periodo de multiplicação. Sob o aspéto de critídia, isto é, flagelado de blefaroplasto em fórma de bastão situado anteriormente e junto ao nucleo, provido de membrana ondulante e flagelo livre, os parasitos multiplicam-se intensamente por divisão binaria, raramente por divisão multipla, assumindo fórmas e dimensões muito variadas (estampa 11).

A existencia de flagelados no duodeno parece manter-se por toda a vida do inséto, á custa da multiplicação dos mesmos. Uma vez infectado o inséto, os parasitos persistem nesta parte do intestino mesmo que as refeições subsequentes sejam feitas sobre animais sãos (Chagas).

Na segunda porção do mesênteron não se encontram tripanosomas metaciclicos; as fórmas de blefaroplasto posterior só existem aí durante os primeiros dias de infecção, e são tripanosomas sanguicolas persistentes sem alterações degenerativas ou evolutivas.

Durante todo seu ciclo no invertebrado o *S. cruzi* não passa por estádio evolutivo caracterisado por flagelados do tipo *Leptomonas*, embora seja comum encontrar-se, nas descrições ou esquêmas representativos do ciclo, referencias á ocorrencia normal de tal fáse de evolução.

Fase retal

Nos insétos com infecção antiga os parasitos localisam-se no intestino posterior, assumindo disposições e aspétos evolutivos caraterísticos que constituem a fáse retal estabelecida.

O grande acumulo de flagelados na ultima porção do tubo digestivo do *T. megista*, onde se originam as fórmas terminais do ciclo evolutivo, e a transmissão do *S. cruzi* ao vertebrado pelas dejeções do inséto, autorisam a classificação deste *Schizotrypanum* como Tripanosomida de evolução na porção posterior e de transmissão contaminativa.

A fáse retal do desenvolvimento do *S. cruzi* no barbeiro é muito semelhante á da evolução do *Trypanosoma lewisi* na pulga (*Ceratophyllus fasciatus*), tal como foi descrita por Minchin e Thomson em 1915. Aplica-se em grande parte ao parasito que estudamos a descrição morfologica feita por estes autores, da fáse correspondente do ciclo do tripanosoma do rato.

De um modo geral, os parasitos que se encontram permanentemente no réto dos triatomas infectados desde longo prazo, pertencem a dois tipos morfologicos definidos, a fórma de critídia e a forma final de tripanosoma, ou a estadios de transição entre a primeira e a segunda.

As critídias que vão passando do mesenteron para o réto tomam um aspéto morfologico mais unifórme; são de um tipo menor, de curto flagelo ou dele destituidas, com grande tendencia a se fixarem pela extremidade anterior ás paredes dor orgão, formando um revestimento ás vezes completo de sua superficie interna. Nas visinhanças do piloro, em córtes longitunidais do réto, a superficie do epitélio estriado mostra-se inteiramente coberta por uma camada de parasitos, nos insétos com a infecção antiga (estampas 6 — 8).

Conforme referimos em uma publicação anterior (1930), a disposição dos flagelados perpendicularmente ao epitélio retal havia sido observada, embora não descríta, por J. Gomes de Faria e O. Cruz Filho. Nesta mesma publicação assinaláramos haver encontrado no tubo digestivo do barbeiro as fórmas evolutivas do *S. cruzi* até então descrítas, entre outras as fórmas intracelulares verificadas por estes autores no intestino posterior do *T. megista* (1927). Pelo exame detalhado dos córtes que tinhamos e dos que depois fizemos desta porção do intestino, chegámos á conclusão de que as fórmas parasitarias que julgáramos ser as descrítas por Faria e Cruz Filho, não ocupavam de fáto situação intracelular, mas sim formavam aglomerados nos intersticios das dobras da região quitinosa da parede rétal. A confusão que fizemos, atribuindo a estes aglomerados uma situação intracelular, tomando-os portanto pelas fórmas de Faria e Cruz

Filho, foi devida a que as secções de intestino posterior que possuimos, praticadas em orgãos fixados em estado de retração, apresentavam aspétos microscopicos dificeis de interpretar á primeira vista.

A estrutura da parede retal só poude ser por nós bem estudada depois que praticámos córtes histologicos em insétos fixados poucos minutos depois se alimentar, ocasião em que o orgão se apresenta dilatado por dejeções que se acumulam no seu interior. As paredes do réto são muito elasticas e retráteis, oferecendo aparencias bastante diversas quando cortadas nos estados extremos de distenção e de retração. As condições são especialmente favoraveis para o exame microscopico dos córtes, tanto para o estudo de sua estrutúra histologica,, como para o da forfología e disposição dos parasitos, quando a empôla rétal é fixada e incluida emquanto dilatada pela excreção hialina dos tubos de Malpighi.

Devemos dizer que nunca vimos em nenhuma porção do tubo digestivo do *T. megista* fórmas evolutivas do *S. cruzi* a que presentemente possamos atribuir uma localisação intracelular. Embora sem excluir a possibilidade da existencia de uma fáse de multiplicação intracelular no ciclo deste parasito no inséto transmissor, supomos que não represente a mesma um periodo de evolução obrigatorio, uma vez que se póde acompanhar todo o desenvolvimento na luz do intestino até finalmente a transformação de haptomonas em tripanosomas na superficie do epitélio estriado do intestino posterior.

A penetração e multiplicação do *S. cruzi* em celulas da parede do intestino foi primeiramente assinalada por Mayer e Rocha Lima (1914), que estudaram a evolução do parasito no *Ornitothodorus moubata*.

—As fórmas parasitarias aderentes ás paredes do intestino posterior de insétos portadores de certos flagelados, durante a fáse terminal de seu desenvolvimento, correspondem aos « estadios gregariniformes » de Léger e foram designadas «haptomonas» por Woodcock (1906); como termo correlativo, Minchin e Thomson (1915) propuseram o de «nectomonas» para designar os organismos critidiomórficos livres no conteúdo retal (*Trypanosoma lewisi*). Empregando estas designações podemos dizer que na fáse retal estabelecida do ciclo evolutivo do *S. cruzi* no *T. megista*, os flagelados se apresentam sob o aspéto de tres tipos morfologicos fundamentais, que são: 1) haptomonas, 2) nectomonas, 3) tripanosoma.

A infecção retal inicia-se com as fórmas de critídia vindas do intestino médio, o que se dá nas larvas novas por volta do 5.º dia depois da ingestão dos tripanosomas sanguicolas.

Chegadas ao intestino posterior as critídias polimorficas (nectomonas) tendem a fixar-se ao epitélio retal ou insinuam-se entre as dobras quitinosas, transformando-se em flagelados de tipo menor e mais unifórme

(haptomonas). Este tipo de parasito constitue a fórma de multiplicação caracteristica da fáse rétal; o fenomeno mais importante desta fáse é, como dissemos, a formação de parasitos de blefaroplasto posterior, os chamados «tripanosomas metaciclicos» (Brumpt), formas terminais do ciclo no Invertebrado.

As transformações evolutivas sucédem-se no réto no sentido nectomas—haptomonas—tripanosoma, normalmente. Não sabemos porém si certas nectomonas pódem se transformar dirétamente em tripanosomas, o que nos parece provavel, nem si as haptomonas pódem voltar ao tipo nectomonas, o que não deve acontecer. Mais certo é que as fórmas de tripanosoma não são suscetiveis de regressão ao tipo de flagelado que as precede.

Segundo Brumpt os metaciclicos não são mais capazes de multiplicação no inséto.

Os parasitos localisados na empôla rétal constituem um «stock» que se mantém indefinidamente sem ser necessaria sua renovação.

Não observámos a existencia de verdadeiros quistos durante o desenvolvimento do *S. cruzi* no inséto.

Tubos de Malpighi

Conforme notificámos precedentemente (1930), os tubos excretores do *T. megista* pódem ser invadidos por fórmas evolutivas do *S. cruzi*. Fáto de observação muito comum é a locilisação de critídias na embocadura dos tubos, isto é, nas suas empôlas terminais. Ocasionalmente, em individuos adultos, verificámos a invasão dos proprios vasos malpiguianos por grande quantidade de flagelados, a ponto de algumas vezes ocuparem inteiramente sua luz (estampa 9).

Os parasitos são critídias relativamente grandes que se mostram fixas pela extremidade flagelar á superficie interna do orgão. O que podemos acrescentar ao que já haviamos dito sobre o parasitismo dos orgãos excretores é que o desenvolvimento dos flagelados póde chegar até á formação de tripanosomas metaciclicos, portanto que a evolução malpiguinana é do tipo retal.

A infecção dos tubos de Malpighi só tem sido por nós observada nos insétos em estado alado, em percentagem relativamente pequena.

Wenyon (1926) menciona a hipotese de fórmas parasitarias do *S. cruzi* passarem á cavidade geral pelos tubos excretores e daí as glandulas salivares.

—Glandulas salivares e cavidade geral:

Nas glandulas salivares do *T. megista* (glandulas principais) foram

encontradas 3 vezes por Chagas (1909) fórmas parasitarias de blefaroplasto posterior as quais representam para este pesquisador as verdadeiras formas infectantes do ciclo do Invertebrado. Barros Barreto (citado por Marques da Cunha, 1923) achou tambem parasitos nas glandulas salivares. A passagem dos flagelados pela cavidade geral segundo Chagas é muito transitoria, tendo sido por ele aí surpreendidos sómente duas vezes, em triatomas achados com infecção natural.

A invasão da cavidade geral e das glandulas salivares do *T. megista* por fórmas de evolução do *S. cruzi* não foi assinalada por outros autores e não foi por nós observada.

Como veremos adiante, as fórmas sanguicolas do *S. cruzi* evoluem artificialmente na cavidade geral do barbeiro até a formação de tripanosomas metaciclicos; tambem estes pódem permanecer vivos durante alguns dias, quando aí inoculados.

Dejeções do *T. megista*.

As diversas especies de dejeções dos triatomas foram por nós (1932) anteriormente estudadas, no que respeita a seus caractéres, suas condições de eliminação e á sua importancia na transmissão da molestia de Chagas.

Como em todos os insétos, distinguem-se nos barbeiros duas especies de dejeções, as féses e a excreção malpiguiana. Esta é um liquido amarelado que séca rapidamente ao contáto com o ar; as féses, negras, são de dessecação mais lenta (Neiva).

A excreção urinaria é eliminada segundo as circunstancias sob aspétos diferentes, que nos permitem distinguir duas variedades bem distintas: uma delas, tal como tem sido descrita, é um liquido amarelo, turvo, rico em cristais; a outra é incolor, transparente e fluida. Pódem respetivamente ser designadas por urina granulosa e urina hialina ou limpida.

A urina hialina é eliminada em estado de pureza pelos barbeiros durante as primeiras horas que se seguem ás refeições: em geral alguns minutos depois de terminarem a sucção, ou durante a mesma, os triatomas emitem dejecções negras ou amarelas, e pouco depois eliminam gotas de um liquido, que poderá conter ainda traços de féses ou cristais, ou ser completamente incolor e transparente, assemelhando-se a gotas d'agua. Com intervalos variaveis os insétos continuam a expulsar excreções com estes caratéres, sendo tambem muito variavel a quantidade total e o numero de vezes em que são eliminadas.

As urinas emitidas pelos barbeiros algumas horas depois do repasto começam a ficar novamente turvas pela presença de cristais ou de féses; durante os intervalos entre as refeições as excreções que se acu-

mulam no réto são eliminadas ao mesmo tempo, com o aspéto de um liquido mais ou menos denso, enegrecido e rico em cristais. A urina amarela (granulosa) póde ser tambem eliminada sem ser de mistura com féses.

A excreção hialina do *T. megista* é um liquido de reação alcalina, que não contem substancias coagulaveis pelo calor, cristais nem elementos celulares. A presença de acido urico póde ser verificada pela reação da murexida.

A urina granulosa contem numerosos cristais de urato de sódio, soluveis na potassa e na soda caustica de 10 % e insoluveis nos acidos. Segundo P. Marchal (1890) « a secreção de acido urico é um fáto geral entre os insétos e afóra pequenos grupos, sómente os Hemipteros fazem exceção » : O acido urico livre ou sob a fórma de urato de sódio foi assinalado nas excreções do *Triatoma rubrofasciatus* por A. Lafont (1912). Brumpt e P. da Silva (1912) julgaram como sendo de guanina os pequenos granulos brancos encontrados nos excrementos de uma ninfa de *T. megista*. A urina granulosa tem reação francamente acida.

Seguindo o conselho de Dr. E. Villela, injetámos na cavidade geral de barbeiros adultos, pouco tempo depois de picarem, indicadores corados, para comprovarmos a origem malpiguiana das excreções limpidas. Os insétos inoculados com uma solução de vermelho fenol eliminavam algum tempo mais tarde urinas hialinas coradas em róseo e horas depois urina granulosa de reação acida.

Poucos minutos depois do inséto terminar a sucção a empôla retal se apresenta fortemente dilatada pelas dejeções, que se renovam mais ou menos rapidamente após cada expulsão. Nestas condições póde-se obter com facilidade o liquido limpido, por expressão ou percussão do abdomen do barbeiro, podendo o mesmo ser projetado a distancia bastante grande. Em condições naturais, no interior de uma cafúa em Lassance, observámos a expulsão em jacto de algumas gotas de urina limpida por uma ninfa de *T. megista* cujo abdomen percutimos levemente e que acabara de sugar um homem.

Os triatomas em todas as idades eliminam as dejeções com os diversos aspétos que enumeramos. A quantidade total de urina hialina emitida após cada refeição por adultos e ninfas de *T. megista* é relativamente muito grande.

O principal interesse das excreções limpidas dos barbeiros reside no fáto de que, quando provêm de insétos infectados, contem quasi sempre flagelados em grande numero.

As unicas referencias que conhecemos relativas á eliminação de dejeções limpidas pelos triatomas, e á presença de *S. cruzi* nas mesmas, são as de Brumpt

e Pirajá da Silva (1912), que obtiverem «um liquido excrementicial claro» pela compressão do *Conorrhinus*, e a de H. C. de Souza Araujo (1918) que observou sua eliminação natural por uma femea de *Triatoma infestans*. Brumpt (1914), tratando da coprofagia nos Hemipteros, diz que os *Rhodnius*, depois de eliminarem suas «dejeções negras ou hialinas», aspiram-n'as completamente.

Ao exame microscopico das excreções limpidas eliminadas por barbeiros infectados pelo *S. cruzi*, os unicos elementos que se póde distinguir são os parasitos, que são dotados de intensos movimentos, em numero e estadio evolutivo que variam segundo a idade da infecção.

As excreções de imagens e ninfas de *T. megista* portadoras de infecção antiga são quasi sempre muito ricas em flagelados, cuja grande maioria é composta pelas fórmas metaciclicas. Em geral as critídias aí são raras, ás vezes mesmo ausentes; em certas ocasiões porém pódem ser numerosas, isoladas, formando pequenos grupos ou em aglomerados compactos.

Os parasitos provêm da empôla retal dos insétos, onde, como vimos, existem em grande numero, fixados ás suas paredes ou livres no seu interior. Dissecando-se triatomas com o intestino posterior dilatado pela excreção malpiguiana limpida, pouco depois da sucção, e examinando-se ao microscopio evitando-se sua rutúra, póde-se observar perfeitamente pela transparencia das paredes e do conteúdo do réto, os parasitos nele contidos, com seus ativos movimentos e por vezes em numero consideravel (obj. AA, oc. 20, Zeiss) (v. fig. 9).

O mesmo barbeiro póde eliminar grande numero de tripanosomas todas as vezes que em seguida a uma refeição emite dejeções limpidas. Uma vez, em urinas que não eram das mais ricas em flagelados, calculámos mais de 3,500 parasitos por mm^3.; como a figura 17 mostra, as dejeções de adultos infectados desde muito tempo podem conter verdadeiras massas parasitarias.

Como em regra os metaciclicos existem nas urinas limpidas de triatomas adultos em numero incomparavelmente maior que as critídias, parece que no réto é possivel que as critídias aderentes (haptomonas) tenham a capacidade de se transformar rapidamente em fórmas de blefaroplasto posterior.

As fórmas metaciclicas do *S. cruzi* são organismos muito moveis, delgados e alongados, de dimensões variaveis, medindo em média 17 micra de comprimento. Têm nucleo alongado, mediano ou mais proximo á extremidade posterior, blefaroplasto esférico sub-terminal, grande. O flagelo é unido ao corpo do protozoario e tem uma porção livre pequena; o

protoplasma, geralmente homogeneo, apresenta ás vezes pequenas granulações que não sabemos si são devidas a artificio de técnica.

Nas preparados de dejeções examinados a fresco ou após coloração, nunca vimos fórmas metaciclicas como sinais de divisão; em *frottis* de réto encontrámos uma vez um parasito tripanifórme provido de 2 nucleos e 2 blefaroplastos, que poderia ser interpretado como resultante da evolução rapida de critídia em divisão não terminada. Acreditamos que uma vez atingida a fórma de tripanosoma os parasitos não sejam mais capazes de se multiplicar. (Brumpt).

Nunca encontrámos fórmas de resistencia (quistos) no réto ou nas dejeções dos triatomas infectados.

Nas preparações coradas pelo Giemsa após fixação pelo alcool absoluto os tripanosomas mostram-se frequentemente deformados ou completamente dilacerados. Mesmo nos preparados préviamente fixados pelos vapores de tetróxido de osmio — processo recomendavel neste caso — os flagelados podem apresentar deformações.

Conseguem-se preparações bôas quando os esfregaços são delgados; deixando-se o material secar sobre a lamina sem ser bem distendido, embora tenha sido antes exposto aos vapores de acido ósmico e seja depois fixado pelo alcool absoluto, os parasitos sofrem alterações, perdendo seus detalhes morfologicos.

A fixação em estado humido exige que a urina seja misturada a um liquido albuminoso (póde-se empregar sem inconveniente o proprio liquido da cavidade geral do barbeiro).

—Numa urina conservada á temperatura ambiente em uma pipeta fechada na ponta, observámos a sobrevivencia de parasitos até 48 horas depois de sua eliminação. Quando as dejeções ficam em pequena quantidade expostas á dessecação os flagelados imobilisam-se e morrem em pouco tempo, antes mesmo que a evaporação tenha sido completa.

Material muito apropriado para certos estudos são as excreções hialinas do *T. megista*, pela sua riquesa em fórmas parasitarias. Além de constituirem o melhor material para experiencias de transmissão, prestam-se muito para o estudo da resistencia dos metaciclicos e das critídias a diversos agentes (dessecação, temperatura, agua distilada, sais biliares, etc), isolamento de fórmas de evolução para inoculações e culturas, experiencias de tropismos, etc. Todos estes estudos estão por ser feitos.

—A eliminação de grande numero de fórmas de evolução do *S. cruzi*, tripanosomas metaciclicos em grande concentração e ás vezes em estado de puresa quasi completo, em certas dejeções do barbeiro, nas ocasiões em que o hematofago se aproxima do Vertebrado, é já uma indicação do papel destas dejeções na transmissão da doença de Chagas.

A verificação das propriedades biologicas das fórmas metaciclicas, principalmente penetrabilidade, pela obtenção de infecções experimentais por meio de tais fórmas através tegumentos integros de animais, demonstram a realidade do método contaminativo da transmissão desta tripanosomiase.

Infectividade das fórmas evolutivas do *S. cruzi* no inséto.

Em varias especies de tripanosomas que têm uma evolução ciclica no Invertebrado transmissor, os parasitos ingeridos pelo hematofago em pouco tempo perdem a infectividade, como foi estabelecido para certos tripanosomas transmitidos por Glossinas e para o *Trypanosoma lewisi*, não sendo reinoculaveis aos animais sensiveis senão depois de decorrido um prazo mais ou menos longo, durante o qual passam-se fenomenos evolutivos de que resultam as fórmas propagativas finais.

Esta « incubação » mostra que os insétos vectores de certas tripanosomiases não são simples portadores do germen, mas verdadeiros hospedadores intermediarios nos quaes os parasitos evoluem, tornando-se novamente aptos a infectar o hospedador Vertebrado.

O *T. lewisi,* que é um flagelado mais próximo do *S. cruzi* que os tripanosomas patogenicos transmitidos por tsétsés, pouco tempo depois de ingerido pela pulga (*Ceratophyllus fasciatus*) perde a capacidade de infectar ratos, por inoculação ou por ingestão do inséto, para só a recuperar quando no intestino posterior tenham aparecido as fórmas terminais do ciclo evolutivo, os tripanosomas metaciclicos. Assim, os flagelados encontrados no tubo intestinal da pulga, de 1/2 a 1 hora até o quarto dia pelo menos, não infectam ratos quando neles inoculadas; no ciclo do *T. lewisi* as fórmas finais, unicas infectantes, aparecem ao fim de um prazo minimo de 5 dias no réto do inséto (Minchin e Thomson, 1915).

Os tripanosomas sanguicolas introduzidos com o sangue do rato no estomago da pulga, perdem a infectividade para o roedor mesmo antes de sofrerem as primeiras alterações evolutivas; o *T. lewisi* na fáse de critidia tambem não é infectante.

Para verificar o poder infectante das fórmas de evolução do *S. cruzi* no intestino do inséto, fizemos uma série de experiencias com o *T. megista,* em condições variadas, e algumas com *Cimex lectularius*.

1)—*T. megista* (adultos)—Um lóte de barbeiros provavelmente já infectados, que haviam sugado uma cobaia normal 17 dias antes, foi alimentado em 29-X-32 sobre cão bastante infectado pelo *S. cruzi* (13º dia de infecção obtida por inoculação de dejeções hialinas com numerosos tripanosomas). A diversos prazos depois da refeição infectante fizemos a dissecção de barbeiros deste lóte, inoculando em cobaia, separadamente, as duas por-

ções do mesenteron (isoladas de modo a evitar a rutura do reto). As inoculações foram feitas por via peritonial.

As experiencias estão esquematizadas neste quadro:

QUADRO 5

Cobaia no.	Horas de infecção	Orgão inoculado	Data da inoculação	Novembro 1932								Incubação
				5	7	8	9	10	12	14	16	
1	3—4	E	29—X	—	+							8—9 dias
2	3—4	EI	29	—	—	—	—	—	—	+		15—16 «
3	18	E	30	—	—	—	+					10 «
4	18	EI	30	—	—	—	—	—	—	—	+	16—17 «
5	48	E	31	—	—	—	—	—	—	—	+	15—16 «
6	48	EI	31	†								

E — 1a. porção do intestino médio (estomago)
EI — 2a. porção (estomago intestiniforme), duodeno.

2)—Grupo de fórmas jovens de *T. megista* (1a. idade, nascidas no laboratorio) foi alimentado pela primeira vez em cobaia infectada (raça de tatú, 29º dia) em 11-I-33. Cada dia, de 12 a 18-I-33, portanto do 1.º ao 7.º dia de infecção, dissecavamos uma larva e injetavámos o tubo digestivo macerado em agua fisiologica em uma cobaia, por via sub-cutanea.

As cobaias inoculadas com larvas no 1.º, 4.º, 5.º e 7.º dias de infecção morreram antes do prazo necessario á observação.

As inoculações de larvas 2 e 3 dias depois de infectadas foram positivas; os periodos de incubação foram respectivamente de 15-17 dias e de 23-25 dias.

A cobaia injetada com material de larva no 6º dia, examinada espaçadamente, não apresentou tripanosomas no sangue.

3)—Inoculações totais de tubo digestivo de larvas novas de *T. megista* em camonodongos brancos, por via subcutanea.

Sugaram cobaia infectada, em 18-II-33; inoculações diarias do 4º ao 8º dia de infecção, todas positivas (quadro 6).

QUADRO 6

Camondongo no.	Dias de infecção	Data da inoculação	Março 1933							Incubação
			5	8	9	10	11	12	13	
1	4	22-II-33	—	—	+					15 dias
2	5	23	.	+						13 « Mx.
3	6	24	.	—	—	—	—	—	+	17 «
4	7	25	.	—	—	—	—	—	+	16 «
5	8	26	.	—	—	—	—	—	+	15 «

Nota: Os exames dos dias 11 e 12-III-33 não foram muito demorados.

Pelos resultados destas experiencias vimos que os insétos dissecados desde poucas horas após a sucção de animal infectado, até 8 dias, injetados em animais sensiveis, são capazes de determinar a infecção. Portanto, durante toda a evolução do *S. cruzi* no *T. megista,* ha fórmas infectantes para o Vertebrado, antes que comecem a se formar os tripanosomas metaciclicos (6-7 dias) no intestino posterior. A inoculação positiva de larva no 6º dia de infecção, que conseguimos na experiencia *3* e falhou na experiencia *2*, já havia sido obtida por Chagas (1909).

No que diz respeito á infectividade para o vertebrado de estádios evolutivos dos flagelados nos insétos, que precedem as fórmas propagativas finais, existe nitida diferença, em vista destes resultados, entre o que se passa com o *S. cruzi* no *T. megista* e o *T. lewisi* na pulga do rato, segundo as verificações de Minchin e Thomson.

Quaes serão os parasitos infectantes para o vertebrado, existentes no intestino do *T. megista* durante todo o periodo de evolução anterior ao apparecimento das fórmas metaciclicas do *S. cruzi* ?

Os resultados das experiencias que referimos poderiam ser interpretados como demonstrativos de que este parasito, em todas as fáses de evolução no inséto, conserva a capacidade de infectar o Vertebrado, quando nele inoculado. Entretanto, o fato que verificámos e que já assinalámos precedentemente, da persistencia de fórmas sanguicolas do *S. cruzi* sem sofrer alterações evolutivas ou degenerativas no intestino médio do barbeiro, não justificaria tal interpretação, porquanto a positividade das inoculações de insétos nos primeiros dias poderia correr á conta da persistencia tambem do poder infectante dos tripanosomas sanguicolas ingeridos, á exclusão da participação incriminavel de outras fórmas parasitarias.

Acompanhando a evolução do *Schizotrypanum* nas diversas regiões do tubo digestivo observámos que no intestino médio do *T. megista* encontram-se até varios dias depois da sucção, flagelados com os caractéres das fórmas do sangue do Vertebrado; a presença destas fórmas foi constatada até muitos dias no estomago e até 6 dias no duodeno, isto é, em todo o intestino médio, durante pelo menos o prazo suficiente para que os tripanosomas metaciclicos comecem a se formar no intestino posterior. Por estes fatos compreende-se a permanente infectividade por inoculação dos triatomas, que é devida nos primeiros dias aos tripanosomas não evoluidos, e mais tarde aos tripanosomas metaciclicos.

Como já foi dito anteriormente, na porção tubular do mesenteron encontram-se fórmas de blefaroplasto posterior sómente nos primeiros dias de infecção; depois, os unicos flagelados aí existentes tem a morfologia de critidia, fáse evolutiva que caracteriza esta região do intestino médio. Baseados nestas verificações, continuámos a fazer experiencias com o fim de

esclarecer as propriedades infectantes do Schizotrypanum em diversas fáses de sua evolução, inoculando separadamente em animais as duas porções do mesenteron e verificando o resultado destas inoculações:

4)—Foi inoculado subcutaneamente um camondongo com macerado da porção intestiniforme do mesenteron (EI) em agua fisiologica, no dia 12-VIII-33, de larva de *T. megista* 5 dias depois de sugar um cão infectado pela raça de tatú do *S. cruzi*.

Na lamina preservada do material inoculado encontrámos numerosas critidias, e fórmas sanguicolas mais ou menos conservadas. O camondongo apresentou parasitos no sangue em 26-VIII-33, tendo tido exames negativos até a vespera (incubação 14 dias).

Por esta inoculação ficou verificada a existencia de fórmas infectantes no intestino médio (duodeno, porção tubular) até o 5º dia de infecção. [6]

5)—2 camondongos foram inoculados com material de larva de *T. megista* que 19 dias antes havia sugado um cão infectado (raça de cão). O camondongo A foi injetado com o estomago e o B com o duodeno (retirados sem haver rutura do réto e diluidos em agua fisiologica). Na lamina preservada do E (estomago) havia tripanosomas pouco alterados e fórmas arredondadas; na do EI (duodeno) só vimos critídias, numerosas. Inoculações feitas em 30-VIII-33:

QUADRO 7

	1933 — IX									X											XI	
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	2	5	7	9	10	12	14	16	20	22	26	31	6	11
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−	•	—
B	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	− sc	+	+	++	++	†	†

Como se vê, o camondongo inoculado com estomago infectou-se rapidamente; o inoculado com EI (critidias) não se infectou, adquirindo uma infecção mortal quando injectado com fórmas sanguicolas do *S. cruzi* (Sc). 19 dias depois da refeição infectante existem no estomago de larvas de *T. megista* parasitos patogenicos para o Vertebrado, não os havendo na porção intestiniforme (EI) do mesenteron; a este tempo a inoculação do conteúdo retal seria seguramente infectante, devido á presença de tripanosomas metaciclicos.

No quadro que resume os resultados das inoculações dos camondon-

[6] Em todas as experiencias de inoculação feitas com larvas utilizamo-nos de insectos nascidos e criados no laboratorio.

gos A e B não estão representados todos os exames: entre os dias 20-IX- e 2-X foram feitos 7 exames, com os mesmos resultados dos dias precedentes. O camondongo A morreu com exame de sangue negativo mas no liquido obtido por punção do peritoneo havia tripanosomas no dia da morte.

O animal inoculado com conteúdo intestinal rico em critidias (larva, 19º dia) não teve infecção sanguinea aparente até 46 dias depois da injeção; não mostrou resistencia á inoculação de *Schizotrypanum* (sangue de cão, raça de tatú, infecção no 11º dia, 11a. passagem), morrendo infectado em 21 dias.

A positividade da inoculação de estomago 19 dias depois da refeição infectante é por nós atribuida a fórmas de blefaroplasto posterior provenientes do sangue, que não passaram ao duodeno e permaneceram ligeiramente alteradas no E até este tempo; as figuras 9 e 10 da estampa 11 representam tripanosomas encontrados no estomago de uma larva 21 dias após a refeição contaminante.

Fizemos novas inoculações parciais de intestino médio de insétos, a tempos muito variados depois da ingestão de sangue infectado. Em algumas experiencias os barbeiros depois de infectados foram alimentados em animais normais; as larvas eram puras, nascidas e crescidas no laboratorio, tendo sido alimentadas uma só vez em cães infectados, e o adulto era portador de infecção antiga.

O quadro 8 da pag. 60 reune os principais dados sobre esta série de inoculações e seus resultados.

As porções do intestino médio eram retiradas cuidadosamente e transportadas para uma lamina, onde eram desmanchadas em gotas de sôro fisiologico; depois de aspiradas por meio de uma seringa para ser feita a inoculação, o restante do material sobre a lamina era fixado e corado (lamina preservada). A parte mais delicada da dissecação é a separação do duodeno do intestino posterior; a secção deve ser feita um pouco aquem da inserção dos tubos excretores, evitando-se a lesão do réto. Quando este se rompia, ou quando havia suspeitas de tal, o material era desprezado.

O estomago deve ser retirado em primeiro logar, em seguida o duodeno, ficando o réto no seu logar, intácto.

Segue-se o resultado dos exames das laminas preservadas das larvas inoculadas, segundo o numero dos camondongos que figuram no quadro 9:

1—Tripanosomas arredondados, leishmaniformes.
2—Critidias.
3—Não foram achados parasitos.
4—Critidias.
5—Leishmanias.
6—Critidias.

QUADRO 8 [7]

Camondongos adultos inoculados por via intraperitoneal em 19-IX-33:

Fase do Triatoma e numero	Refeição infectante	Refeição normal	Dias de infecção	Orgão inocu.	Camondongo nº.	IX – 1933						X							XI							Incubação verificada (dias)
						20	23	26	28	29	30	2	4	5	6	7	9	10	5	6	8	9	10	11	13	14	
1 Larva	11 – IX	—	8	E	1	·	†																				—
				EI	2	·	·	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	+	50
2 Larvas	8 – VII	31 – VIII	73	E	3	·	·	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	·	+	·	·	·	·	·	·	13
				EI	4	†	·																				—
2 Larvas	18 – VIII	31 – VIII	32	E	5	·	·	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	·	+	·	·	·	·	·	†	17
				EI	6	·	·	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 adulto	31 – VII	25 – VIII	50	E	7	·	·	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	48
				EI	8	·	·	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	·	—	·	·	·	·	·	·	13

E — Estomago.
EI — Estomago intestiniforme.

[7] Entre 10 - X e 5 - XI - 33 os camondongos n. 2, 6 e 7 tiveram 22 exames de sangue negativos.

O material do adulto (inoculado nos camondongos nº 7 e 8) foi examinado sómente a fresco. Esta experiencia de inoculação de EI não póde ser levada em conta porque os tubos de Malpighi, que estavam repletos de flagelados, foram cortados junto com o intestino tubular, ocasionando a mistura de parasitos de ambas as porções; sabendo-se que a evolução malpiguiana é do tipo retal, a positividade da inoculação em questão foi seguramente devida a tripanosomas metaciclicos. No estomago deste adulto foram vistos raros flagelados critidiomórficos, sendo de notar que o orgão estava vasio, retraído, escurecido na sua parte posterior por conteúdo de aspéto semelhante ao do duodeno; a presença de leishmanias não foi constatada em estado fresco.

Nestas experiencias incorremos em um erro elementar por termos conservado todos os camondongos juntos, num recipiente pequeno, durante todo o tempo de observação. Os resultados das inoculações de que podemos dizer com segurança são os dos camondongos nº:

3: Inoculação positiva de estomago 73 dias depois da refeição infectante e 19 dias depois da alimentação em animal normal. (raça de cão).

5: Inoculação positiva de estomagos de larvas 32 dias depois da sucção de animal infectado e 19 da de animal são. (raça de cão).

6: Resultado negativo da inoculação da 2a. porção do intestino médio das larvas da experiencia precedente, cujos estomagos foram infectantes para camondongo (nº 5).

Os camondongos nº 2 e 7, que tiveram exames de sangue positivos respectivamente 50 e 48 dias depois de inoculados, com muita probabilidade adquiriram a infecção contaminando-se com o sangue dos que já estavam com tripanosomas na circulação desde muitos dias antes.

O camondongo nº 8 infectou-se com material de duodeno e tubos de Malpighi de um adulto muito infectado. A infecção deverá ter sido devida a tripanosomas metaciclicos dos vasos excretores.

Para a devida averiguação de certos pontos obscuros deixados por estas experiencias e confirmação de seus resultados, fizemos nova série de inoculações parciais em circumstancias mais diversas e condições melhores, de que posteriormente daremos conta.

Presentemente, em vista dos resultados das experiencias que referimos, julgamos adquiridas as seguintes noções:

a)— No tubo digestivo do *T. megista* existem fórmas do *S. cruzi* infectantes para o Vertebrado por inoculação desde as primeiras horas até tempo indefinido depois da refeição contaminante.

b)—No estomago do barbeiro permanecem por muitos dias (73) parasitos que, inoculados ao Vertebrado, produzem a infecção. Estes parasi-

tos são nos primeiros dias fórmas sanguicolas e mais tarde fórmas arredondadas (leishmanias) delas diretamente derivadas.

c)—No duodeno (estomago intestiniforme) as fórmas responsaveis pela positividade das inoculações desta região durante os primeiros dias (5) são provavelmente tripanosomas sanguicolas não evoluidos, porque as inoculações feitas depois que só existem critídias, ás vezes muito numerosas, não são positivas (19 e 32 dias; 8 dias?).

Correspondendo estes fátos sempre á realidade, podemos, de um modo geral, dizer o seguinte da condição infectante dos parasitos nas diversas porções do tubo digestivo:

Estomago: Contem fórmas infectantes por inoculação desde o inicio até muito tempo depois da ingestão dos tripanosomas sanguicolas. Póde-se assegurar que o estomago permanece indefinidamente infectante por inoculação, nos insétos regularmente alimentados em animais infectados. A permanencia de parasitos vivos e infectantes foi constatada mesmo depois que o inséto sugou animal normal, após muitos dias o repasto infectante. Os parasitos patogenicos são fórmas sanguicolas mais ou menos alteradas ou leishmanias.

Duodeno: Infectante durante os primeiros dias pela persistencia de fórmas de blefaroplasto posterior (sanguicolas); infectividade verificada até o 5º dia. Mais tarde perde a capacidade de infectar o Vertebrado por inoculação, apresentando então sómente critídias no seu interior (19 dias; 8 dias?). Nunca se encontram fórmas metaciclicas no intestino médio.

Intestino posterior: Não infectante nos primeiros dias, antes que se formem os tripanosomas metaciclicos (6-7 dias nas larvas, 10-15 nos adultos). Estabelecida a fáse retal esta porção do intestino mantem-se infectante indefinidamente.

—As fórmas metaciclicas são os verdadeiros parasitos infectantes do ciclo evolutivo, por serem propagadas naturalmente (Brumpt); além de eliminadas em numero colossal pelas dejeções, (Brumpt, Dias), têm propriedades de resistencia e penetrabilidade que facilitam seu papel etiologico.

—As experiencias que acabamos de descrever tendém a demonstrar que o *S. cruzi* no organismo do inséto transmissor, sob a morfologia de critidia, não tem a capacidade de evoluir no vertebrado quando nele inoculado. Estas experiencias estão naturalmente sujeitas a variações de resultados, devido a certas circunstancias com as quais temos que contar mas que são inevitaveis, além de causas de erro eventuais que poderão ocorrer durante a manipulação. De fáto, para demonstrar a não infectividade das critídias, inoculamos uma região do intestino médio compreendida entre duas outras onde sabemos existirem fórmas infectantes do parasito, que

são o estomago e o réto. A dissecção deve ser além de perfeita, executada com muita delicadeza, para que não passe para o duodeno nada do conteúdo das outras porções. Devemos contar tambem com o parasitismo dos tubos de Malpighi, devido ao qual uma de nossas inoculações foi positiva; especialmente nos adultos de *T. megista*, é muito dificil a separação do duodeno sem se romper os vasos excretores. A possibilidade de se obter resultados positivos pela inoculação da 2.ª porção do mesenteron, muitos dias após a refeição infectante, existirá realmente, independentemente das causas de erro que enumerámos, pelo fáto de que poderão passar fisiologicamente a esta região fórmas parasitarias virulentas presentes no conteúdo estomacal. Assim pois, as infecções obtidas por inoculação do duodeno, não poderão ser desde logo atribuidas aos organismos critidiomórficos do *S. cruzi*, tendo-se em mente os fátos que acabamos de citar; os resultados demonstrativos nestas experiencias de inoculação parcial são os negativos, no caso do duodeno, pela verificação de que póde-se inocular grande quantidade de critídias sem se conseguir a infecção. No caso do estomago os resultados positivos são indicação segura de que no interior deste orgão permanecem por longos dias parasitos infectantes.

Em vista dos resultados que conseguimos consideramos a fórma de critídia no *S. cruzi* no barbeiro como não infectante; Chagas (1909), considerando-a estádio terminal do ciclo assexuado, já afirmara este fáto. Brumpt (1922) tambem é da mesma opinião, assegurando embora que « as critídias, chegadas a um certo estádio de evolução, são infectantes » (Blanchard, 1912). Conforme outros autores indicaram, experiencias decisivas sobre a infectividade de fórmas evolutivas de flagelados devem ser feitas pelo isolamento individual das mesmas por meio de pipetas capilares e posterior inoculação em animal sensivel; no caso do ciclo evolutivo do *S. cruzi* no *Triatoma*, acreditamos entretanto que conclusões definitivas poderão ser baseadas tambem em experiencias de inoculações parciais de tubo intestinal, feitas em determinadas condições, de acôrdo com os fatos que acabamos de expôr.

— Posteriormente á publicação destes primeiros resultados e ás considerações que precedem fizemos uma nóva série de experiencias semelhantes, cujos dados estão esquematizados no quadro 9 da pag. 64.

Por este quadro vemos que todas as inoculações de duodeno (estomano intestinifórme) de barbeiros infectados foram negativas, embora fosse verificada no material injetado a presença de parasitos sob a fórma de critídia, ás vezes em grande numero. As inoculações de estomago de larvas 121 e 59 dias depois de uma refeição infectante foram tambem negativas, assim como a do estomago e do intestino anterior de um triatoma adulto portador de infecção antiga e de refeição infectante indeterminada.

QUADRO 9

Inoculações parciais de tubo digestivo de *T. megista* em camondongos brancos adultos, por via intraperitonial, feitas em 9 de Novembro de 1933:

Triatomas	Refeições infectantes	Refeições normais	Dias de infecção	Orgãos inoculados	Camondongo nº.	Resultados e observações dos animais injetados
Adulto com infecção antiga	?	13-X-33 30-X-33 (em cobaia imune) (?)	?	IA	1	36 exames de sangue negativos, de 20-XI-33 a 25-I-34
				E	2	idem
				EI	3	idem
				IP	4	exame positivo de exsudato peritonial em 15-XI-33 « « « sangue em 18-XI-33
Larva nóva	11-IX-33	21-XI-33	59	E	5	36 exames de sangue negativos, de 20-XI-33 a 25-I-34
				EI	6	idem
Larva nóva	8-VIII-33	31-VIII-33 27-X-33	93	E	7	morreu em 11-XI-33
				EI	8	36 exames negativos, até 25-I-34
2 Larvas nóvas	11-VII-33	31-VIII-33 27-X-33	121	2E	9	idem
				2EI	10	idem
2 Larvas nóvas	11-IX-32	21-X-33	59	2E	11	morreu em 14-XI-33
				2EI	12	36 exames negativos, até 25-I-34

IA—intestino anterior; E—estomago; EI—duodeno; IP—intestino posterior.

O unico resultado positivo foi obtido com o camondongo n.º 4, pela inoculação do intestino posterior do mesmo triatoma adulto.

Segundo o numero de órdem dos camondongos inoculados nesta experiencia, o resultado do exame microscópico das laminas preservadas dos orgãos injetados, no que respeita á existencia de fórmas evolutivas do *S. cruzi* foi o seguinte:

N.º 1 — negativo; 2 — raras leishmanias irregulares; 3 — numerosas critídias; 4 — numerosos tripanosomas metacíclicos e critídias; 5 — só foi vista 1 leishmania de protoplasma granuloso, aparentemente sem blefaroplasto; 6 — critídias; 7 — negativo; 8 — critídias; 9 — negativo; 10 — critídias; 11 — negativo; 12 — critídias.

— Ponto importante a ser mais investigado é o referente ao resultado das inoculações de intestino anterior de triatomas infectados, para a indagação da possibilidade da existencia de fórmas infectantes nesta porção.

Os fatos mais importantes verificados pelas experiencias de inoculações parciais de tubo intestinal de barbeiros parasitados pelo *S. cruzi*, são a permanencia de fórmas infectantes no estomago por muitos dias, e a demonstração de que este flagelado durante a sua fáse de critídia não é suscetivel de se desenvolver no organismo do Vertebrado.

2) — *Cimex lectularius*.

A evolução do *S. cruzi* em artrópodes que não são seus transmissores ou portadores habituais foi verificada primeiramente por E. Brumpt (1912), que experimentou com *Cimex lectularius*, *Cimex boueti* e *Ornithodorus moubata*.

As conclusões mais gerais de Brumpt foram confirmadas por Mayer e Rocha Lima (1914) e B. Blacklock (1914): ficou demonstrado que o *S. cruzi* evolui no tubo digestivo do *C. lectularius*, que a evolução se dá facilmente e que os percevejos permanecem infectados por longo tempo.

-A disposição anatomica geral do tubo digestivo deste Hemiptero é muito semelhante á do *Triatoma* [8]: O intestino médio divide-se em duas porções bem differentes, o estomago, ampular, e o duodeno, tubular, alongado. O intestino posterior é reduzido á empôla retal, separada do mesênteron pela embocadura dos tubos excretores. Não ha proventriculo; o intestino médio serve como reservatorio de alimento e orgão de digestão, (estomago) e região de absorção (duodeno). As dejeções acumulam-se

[8] Ver Patton e Evans, 1929.

no réto e são eliminadas pelo anus; após a sucção os percevejos emitem pequenas gotas de liquido limpido, provavelmente de origem malpiguiana.

—O material que serviu para nossos estudos sobre a evolução do *Schizotrypanum* no percevejo constava de cerca de 200 exemplares de *Cimex lectularius* adultos que nos foram mandados pelo Dr. Octavio Magalhães[9] de Belo Horizonte, onde foram colhidos n'uma habitação infestada. Não encontrámos flagelados no tubo digestivo dos individuos dissecados antes de serem expostos á infecção experimental.

—Nas diversas partes do condúto intestinal processa-se o desenvolvimento do *S. cruzi* no percevejo do mesmo modo que no barbeiro, sucedendo-se as fáses estomacal, intestinal e a retal com os aspétos morfologicos que lhes são peculiares.

No estomago as fórmas sanguicolas sofrem as primeiras fáses da transição para critídia ou transformam-se em organismos arredondados, providos ou não de flagelo. Fórmas parasitarias pódem aí permanecer por muitos dias, com a morfologia de tripanosoma sanguicola até 7 dias pelo menos e de leishmania durante varias semanas; pelos quadros apresentados por B. Blacklock (1914) vê-se que este autor encontrou parasitos no estomago até 42 dias depois da alimentação sobre animal infectado. A hemolise ao correr dos processos digestivos do percevejo é em geral completa em 3 dias.

Para o duodeno passam flagelados em transição para critídia, tripanosomas e critídias completamente formadas. Nesta região dominam parasitos critidiomórficos de diversos tipos, que se multiplicam intensamente.

As primeiras fórmas parasitarias foram por nós encontradas no réto 48 horas depois do repasto; Brumpt refere havel-as achado ao fim das primeiras 24 horas. As critídias continuam a se dividir no intestino posterior e no 5.º ou 6.º dia começam a se transformar em tripanosomas metaciclicos.

Nas nossas experiencias nunca observámos grande acúmulo de fórmas metaciclicas no proctodoeum, onde as critídias sempre predominavam.

Segundo Brumpt e Mayer e Rocha Lima o tubó intestinal do *C. lectularius* constitue ótimo meio de desenvolvimento para o *S. cruzi*, dando-se a infecção em quasi 100 % dos insétos que sugam animal infectado. Nas nossas observações a percentagem da infecção foi bastante inferior, como o foi nas de Blacklock, como póde ser deduzido das tabélas do seu trabalho. A intensidade do parasitismo é muito diversa nos exemplares que sugam o mesmo animal, ao fim do mesmo prazo.

---

[9] A quem muito agradecemos o obsequio.

Transmissão ao Vertebrado:

Fizemos inoculações de conteúdo intestinal de percevejos durante os primeiros dias de infecção, conforme passamos a referir:

I.)—*Cimex* alimentados em cobaia infectada foram dissecados, triturados em agua fisiológica e o conteúdo do tubo digestivo inoculado no peritonio de cobaias sãs, do 3.º ao 8.º dia de infecção. As inoculações feitas depois de comprovada a existencia de flagelados, tiveram resultados positivos (6.º e 7.º dia de infecção, periodo de incubação dos animais inoculados respectivamente 22 e 21 dias) e resultados negativos (3.º e 4.º dia).

Os animais injetados com *Cimex* no 5.º e 8.º dias morreram 13 e 12 dias depois da inoculação.

2)—Tubo digestivo de percevejos alimentados em cobaia infectada (raça de tatú) inoculado em cobaias normais durante os 6 primeiros dias. Resultados:

Positivos: 3.º e 6.º dias (incubação 25-30 e 18-20 dias resp.).
Negativo: 2.º dia.

O resultado das outras inoculações não poude ser observado por morte dos animais antes de prazo suficiente.

— Blacklock fez inoculações de Cimex infectados tambem com resultados inconstantes: em 32 animais inoculados (camondongos e cobaias) obteve 9 resultados positivos, com percevejos de 21 horas a 77 dias depois de sugar sangue parasitado. As inoculações positivas obtidas com *Cimex* antes do tempo necessario á formação de metaciclicos foram com 21 e 72 horas após a sucção.

Antes de proceder á injeção o autor verificava a presença de parasitos no material, observando em 3 percevejos inoculados com resultado positivo a existencia de fórmas semelhantes ás « blood-forms » que não eram senão tripanosomas metaciclicos. As incubações médias foram de 22 dias para camondongos e 25 dias para cobaias. O autor não poude chegar a conclusão quanto ás formas responsaveis pela infecção.

Mayer e Rocha Lima obtiveram inoculação positiva de percevejo, no qual só viram formas de critídia, alimentado 9 dias antes em animal parasitado. Ao fim deste prazo é muito provavel que já existissem fórmas metaciclicas no réto, cuja exclusão não póde ser garantida pelo exame de esfregaços.

Segundo Brumpt as fézes dos percevejos são infectantes desde 8 a 10 dias depois de contraída a infecção.

—Como acabamos de ver, as experiencias de inoculação de percevejos infectados dão resultados comparaveis ás feitas com triatomas, distinguindo-se apenas pela inconstancia dos resultados positivos. Estes, quando obtidos com percevejos antes do 5.º dia (conseguidos com 21 e 72 horas por Blacklock e com 3 dias por nós) devem ser atribuidos a fórmas do sangue não evoluidas, como acontece no caso dos barbeiros, com mais frequencia.

A inconstancia dos resultados positivos das inoculações de *Cimex* infectados, antes ou depois de estabelecida a infecção, mostra que o *S. cruzi* não encontra condições de evolução tão favoraveis neste Hemiptero quanto no *T. megista*.

Mayer e R. Lima tentaram sem resultado a transmissão do *Schizotrypanum* a animais naturalmente, isto é, sem inoculação, alimentando sobre eles percevejos infectados.

Em 28 experiencias análogas Blacklock conseguiu 1 vez a infecção em cobaia. Este autor observa que os *Cimex* defecam comumente sobre o animal, em muitos casos contendo as dejeções numerosos parasitos e sendo infectantes por inoculação; conclue que « embora os percevejos sejam capazes de conservar parasitos infectantes por longo tempo, não se consegue em geral transmitir a infecção a animais sãos, mesmo nas melhores condições de transmissibilidade ».

A. Robertson (1929) verificou a evolução do *S. cruzi* isolado da gambá no *Cimex rotundatus*, observando a eliminação de fórmas metaciclicas no liquido limpido eliminado pelo inséto após a sucção («secreção malpiguiana?). Brumpt (1913) tendo conseguido facil desenvolvimento do parasito neste Hemiptero, chegou a supôr que na natureza o *C. rotundatus* exercesse como transmissor papel tão consideravel quanto o do *T. megista*.

Nas habitações de Lassance e arredores nunca encontrámos percevejos portadores de flagelados, mesmo nas cafúas em que os barbeiros se apresentavam em alta percentagem infectados pelo *S. cruzi*. A suposição de Brumpt não encontra apoio nos fátos experimentais ou de observação.

—Brumpt (1914) fazendo *C. lectularius* sugar dejeções de *T. megista* ricas em metaciclicos (em mistura com sangue desfibrinado de boi) verificou que em 3 dos 14 insétos em experiencia a infecção se estabeleceu; não observou modificações nas fórmas metaciclicas ingeridas, atribuindo o desenvolvimento a critídias existentes nas dejeções, que teriam passado desapercebidas.

—Não foi observada a transmissão hereditaria da infecção no *Cimex*.

TRANSMISSÃO DO S. CRUZI ENTRE OS INVERTEBRADOS

Ha tres possibilidades para a realização da transmissão de parasitos digenéticos entre os hospedadores invertebrados: a transmissão por herança, de uma geração a outra através os ovos, e a transmissão de individuo a individuo dirétamente, pela subtração do conteúdo intestinal através o exoesqueleto (canibalismo), ou indirétamente, pela ingestão de dejeções (coprofagía).

Desde suas primeiras pesquisas Chagas verificou que larvas de *T. megista* nacidas no laboratorio nunca se apresentavam infectadas pelo *S. cruzi* e que permaneciam indenes quando sempre alimentadas em animais normais. Mayer e Rocha Lima (1914) não conseguiram a infecção em camondongos pela inoculação de óvos provenientes de *T. megista* infectado; neste inséto Torres (1915) em numerosas observações tambem não verificou a transmissão hereditaria do parasito, assim como Lafont (1912) não a havia notado no *T. rubrofasciata*. A' exceção de Mayer (1922) todos os autores que têm investigado esta questão só tem tido observações negativas.

As experiencias que fizemos a respeito, tambem com resultado negativo, são as seguintes:

1)— 25 larvas nóvas de *T. megista*, de menos de 15 dias de idade e nunca alimentadas, foram trituradas em agua fisiologica e inoculadas no peritonio de uma cobaia, em 26-VII-32. Estas larvas naceram de óvos de femeas infectadas; do mesmo lóte foram dissecadas outras 7 e examinadas a fresco, não tendo sido encontrados flagelados. A cobaia inoculada teve exames de sangue negativos até 24-XI-32.

2)—30 óvos postos por *T. megista* infectados foram inoculados após maceração no peritonio de uma cobaia, depois de ter sido feito o exame a fresco do material com resultado negativo. A inoculação foi feita a 26-VII-32; a cobaia teve exames negativos até 20-XI-32 e inoculada neste dia com macerado de percevejo no 6.º dia de infecção, apresentou-se infectada em 12-XI-32.

Em resumo, pela inoculação em cobaia de 25 fórmas jovens de *T. megista* nacidas no laboradorio e de 30 óvos de barbeiros infectados, não constatámos a transmissão hereditaria do *S. cruzi* neste inséto.

O canibalismo foi observado pela primeira vez em insétos do genero *Triatoma* por A. Machado (*T. megista*, *T. sordida*), tendo sido depois verificado por Brumpt em outras especies (*T. infestans*, *T. chagasi*) e no *Rhodnius prolixus*.

M. Torres (1915) observou no laboratorio a pratica do canibalismo

nas espécies *T. megista* e *T. sordida* durante a 1.ª e 2.ª fáse larvaria, com muito maior frequencia neste Hemiptero que naquele. Segundo Torres este meio de alimentação é absolutamente excepcional em condições naturais e não póde ser invocado para explicar a generalidade do parasitismo natural dos barbeiros; as larvas que praticam a refeição canibal alimentam-se não do sangue mais ou menos digerido que se encontra no estomago, mas da hemolinfa, onde não existem fórmas de evolução do *S. cruzi*. Outra observação em que apóia sua conclusão é a de que na natureza o *T. megista* é raramente parasitado durante as primeiras fáses de sua evolução, justamente naquelas em que unicamente se tem observado o canibalismo.

Em diversas experiencias que fez no laboratório Torres não conseguiu a transmissão do *Schizotrypanum* de inséto a inséto por este meio. Excetuadas as circunstancias em que as larvas exercem um hematofagismo indiréto pela sucção do sangue ingerido de pouco por outro barbeiro, este pesquisador nunca observou a punção do tubo digestivo, enchendo-se a larva canibal de liquido celômico e não de conteúdo intestinal.

Em experiencias feitas recentemente pelo Dr. Chagas foi verificada a transmissão da infecção a larvas de *T. megista* que praticaram o áto canibal em ninfas do mesmo inséto, havendo nós mesmo tambem conseguido este resultado.

A coprofagía foi assinalada por Brumpt (1914) no *Rhodnius prolixus*, não o tendo sido ainda nas especies do genero *Triatoma* (Brumpt, Torres). A possibilidade do *S. cruzi* transmitir-se de um inséto a outro por intermedio das dejeções foi primeiramente entrevista por Lutz (citado por Chagas, 1909); aquele autor tambem não observou o coprofagismo.

Por duas vezes encerrámos larvas famintas de *T. megista* em placas de Petri contendo dejeções limpidas do inséto adulto, não havendo nenhuma delas aspirado o liquido.

A demonstração experimental de que flagelados do intestino do inséto pódem evoluir e determinar a infecção em outro foi dada por Brumpt (1914), fazendo percevejos ingerir dejeções infectadas de *T. megista* misturadas com sangue desfibrinado de boi. Brumpt verificou que dentre 14 Cimex experimentados, a infecção se estabeleceu em 3, em percentagém muito inferior portanto á que verificára em insétos da mesma especie alimentados sobre animal infectado pelo *S. cruzi*.

Este autor não observou em percevejo sacrificado pouco tempo depois de ingerir os flagelados das dejeções (20 horas) alterações morfologicas nos tripanosomas metaciclicos que indicassem sua regressão ao tipo critídia, admitindo que os parasitos desta categoria existentes nas de-

jeções e que passaram desapercebidos ao exame imediato é que tenham proliferado e evoluido em tres dos percevejos que exerceram artificialmente o coprofagismo.

Com o *S. cruzi* fizemos apenas 1 experiencia análoga, utilizando-nos dejeções hialinas de *T. megista* ricas em fórmas de tripanosoma, misturadas com sangue desfibrinado de camondongo, e de um exemplar adulto de *T. sordida*. O material foi colocado em um tubo estreito e sugado pelo hemiptero através péle fresca de camondongo. No estomago e no duodeno do inséto sacrificado 4 dias depois encontrámos raros tripanosomas metaciclicos não alterados; no intestino posterior havia numerosos flagelados, certamente devido a infecção antiga.

—Quaes as fórmas de evolução do *S. cruzi* capazes de transmitir a infecção entre os Invertebrados?

A resposta em parte a esta questão é dada pelas seguintes palalavras de Chagas (1909): «. . . . os estádios de critídias, no *Conorrhinus*, nenhuma significação têm para a infecção do Vertebrado; representam talvez, um retrocesso á condição larvaria primitiva, devido ás influencias do meio, podendo ainda servir, caso haja infecção pelos excrementos, para manter a vida do protozoario nas gerações sucessivas de conorrínos» (p. 58).

De fáto, as critídias são o tipo de flagelado proprio do inséto, e a elas deve ser atribuida a transmissão, quando possivel, do parasito entre os Invertebrados.

Caracteristica de grande importancia do ciclo evolutivo de Tripanosomidas de Vertebrados (*Tripanosoma, Schizotripanum*) no hospedador intermediario é que as fórmas finais, propagativas, são do tipo tripanosoma.

Estas fórmas, como em geral é admitido, não mais se multiplicam no invertebrado (Brumpt), sendo aptas unicamente a transmitir a infecção ao Vertebrado. Conforme experiencias que descreveremos adiante é muito provavel que os metaciclicos não possam voltar ao tipo de flagelado que o precede, critidiomórfico, o que tambem as experiencias de Brumpt, com percevejos, tendem a demonstrar. As fórmas de tripanosoma que fecham o ciclo do Invertebrado são portanto verdadeiramente «metaciclicas» (Brumpt), pois sendo reais as propriedades que enumerámos, serão em consequencia incapazes de evoluir em cultura e de transmitir a infecção entre os insétos, só podendo infetar o hospedador Vertebrado.

Entre os Tripanosomidas destes generos e os outros, proprios de Invertebrados, monogenéticos, ha pois esta diferença fundamental concernente ás fórmas terminais do ciclo evolutivo, que nestes são quistos pelos quais se propagam os flagelados, e naqueles são fórmas metacíclicas adaptadas exclusivamente a infectar o Vertebrado. Não se poderá dizer com Brumpt

(1913) que «os metaciclicos ficam numa *phase d'attente* comparavel ás fórmas enquistadas dos flagelados de insétos, eliminadas pelas fézes» . . . e muito menos que «este fáto demonstra que a doença do Vertebrado é um fenomeno acidental e estes tripanosomas são ainda mal adaptados». A doença do Vertebrado, ou melhor seu parasitismo, constitue fenomeno indispensavel á sobrevida das fórmas metaciclicas do transmissôr, que são lançadas com as dejeções no mundo exterior e inaptas á evolução em outro inséto; no caso do *S. cruzi* a transmissibilidade por contaminação encontra condições o quanto possivel favoraveis que são, principalmente, como vimos, a eliminação de grande numero de fórmas infectantes nas ocasiões em que o inséto procura o Vertebrado e o grande poder de penetração que possuem estes parasitos. Conhecendo-se além disso os habitos estritamente domiciliares do *T. megista*, o principal transmissôr do *S. cruzi*, não se poderá achar razões para dizer que a doença humana tambem é um acidente, sendo o homem «um hospedador tão favoravel quão acidental» (Brumpt).

A existencia de fórmas de leishmania no cíclo do *S. cruzi*, quér pela fáse de evolução em que aparecem, quér pela propriedade infectante de que gósam, não póde servir de argumento a favor do próximo parentesco entre este parasito e os flagelados dos generos Critídia e Leptomonas (Herpetomonas).

A permanencia de fórmas infectantes no estomago por longo tempo, por nós observada, terá alguma significação para a transmissão do *Schizotrypanum*? Esta é uma questão de grande interesse teorico e pratico. As hipóteses do papel destas fórmas na transmissão ao Vertebrado (infecção pela picada, por regurgitamento do conteúdo estomacal) e na transmissão entre os Invertebrados (canibalismo) deverão ser consideradas, e verificadas suas possibilidades por experiencias numerosas.

Considerando-se a função dos quistos e a dos metaciclicos, portanto tambem suas propriedades, não poderão ser comparados uns e outros elementos parasitarios; por uns o flagelado se propaga entre artrópodes, (quistos) não sendo eles inoculaveis ao Vertebrado; por outros, ao contrario, a infecção se transmite exclusivamente ao Vertebrado (metaciclicos).

Deixaremos assinalado que os fátos da incapacidade dos metaciclicos eliminados com as dejeções serem incapazes de manter a infecção entre os invertebrados, no caso dos Tripanosomidas de evolução posterior, e a não transmissão entre os invertebrados dos Tripanosomidas que evoluem na porção anterior, são fatos que poderão ser com mais facilidade interpretados si o Vertebrado fôr considerado o hospedador primitivo destes flagelados (theoria de Minchin); tanto mais que considera-se a evolução posterior mais primitiva e a evolução anterior mais incompleta ou mais recente em relação ao invertebrado.

Não queremos entrar nestas debatidas questões de filogenia de Tripanosomidas.

Para concluir, não julgamos que se possa dizer que o *S. cruzi* é um banal flagelado intestinal primitivo do inséto, acidentalmente transmitido ao Vertebrado (Brumpt): por todas as suas propriedades biologicas o *S. cruzi* é um parasito digenético bem adaptado a ambos os hospedadores.

IV) — **Transmissão do S. cruzi do Invertebrado ao Vertebrado:**

Sumário: Transmissão por inoculação, por picada e pelas dejeções. Penetrabilidade das fórmas sanguicolas e metacíclicas. Considerações gerais.

— A transmissão experimental do *S. cruzi* de insétos infectados a animais sensiveis tem sido conseguida por tres maneiras:

1)—Por inoculação do conteúdo intestinal ou das dejeções.

2)—Por ingestão do Invertebrado ou de suas excreções.

3)—Por alimentação dos transmissôres sobre os animais.

A transmissão por inoculação foi obtida desde os primeiros estudos sobre o *Schizotrypanum* (Chagas). A inoculação de dejeções limpidas foi feita primeiramente por Brumpt e Pirajá da Silva (1912) e depois por Souza Araujo (1918), que infectaram, aqueles, camondongos por inoculação intraperitoneal de liquido de uma ninfa de *T. megista*, este, uma cobaia com dejeções de um exemplar de *T. infestans*. Nós mesmo temos conseguido infecções intensas e mortais por injeção de excreções hialinas de *T. megista* sob a péle ou no peritoneo de animais (cão, camondongo, cobaia).

O aspecto novo da transmissão por inoculação é o que referimos a respeito das inoculações parciais do tubo digestivo de *T. megista*, que demonstraram a longa permanencia de fórmas infectantes no estomago e que são até certo ponto, atualmente, demonstrativas da não infectividade das critidias.

A transmissão do *S. cruzi* entre animais silvestres póde-se dár por ingestão do inséto infectado, sendo com muita probabilidade o que acontece com os tatús e os macacos (*Chrysothrix*). No laboratorio observámos tatús devorarem exemplares adultos de *T. megista*, quando permaneciam juntos num recipiente de um dia para outro. Brumpt (1919) julga muito importante este método de propagação natural entre ratos e camondongos; sómente agora, depois dos trabalhos de Kofoid e Donat (1933) entrevê-se a

probabilidade de serem ratos do mato (*Neotoma fuscipes*) hospedadores naturais do *S. cruzi*, na California.

Por este processo ou pela ingestão de dejeções infectadas conseguem-se facilmente infecções experimentais em cobaias e camondongos brancos; em ratos, dada sua maior resistencia, os resultados são muito mais incertos.

A transmissão da infecção a um *Callithrix* foi a primeira verificação feita por Oswaldo Cruz, em barbeiros que lhe enviára Chagas, da patogenicidade dos flagelados que este pesquizador encontrára no tubo digestivo do *T. megista*; foi verificada a transmissibilidade por meio da sucção do Vertebrado pelo Hemiptero.

Sobre o mecanismo verdadeiro da transmissão natural divergem as opiniões dos autores. Atualmente ha duas escolas, a de Chagas, que admite a transmissibilidade pelo proprio áto da picada, por meio de fórmas infectantes localisadas nas glandulas salivares, que seriam inoculadas durante a sucção, e a de Brumpt, segundo a qual a propagação se faz exclusivamente pelas dejeções, onde ha grande numero de tripanosomas metaciclicos provadamente infectantes.

Consideraremos em primeiro logar os dados experimentais existentes sobre a transmissibilidade pela picada.

Magarinos Torres (1915), colocando-se em bôas condições de experimentação, verificou a infectividade da picada de barbeiros parasitados. Os insétos eram colocados dentro de tubos onde não poderiam se virar e sugavam o animal através uma gaze, tendo com ele contáto unicamente pela probócida.

Na primeira experiencia fez com que 6 adultos e 13 ninfas de *T. megista* sugassem um gato de 1 mês, colocando 1 em cada tubo fechado com gaze, em 28-VI-13; no dia 21-VII-13 o gato apresentou ao exame a fresco tripanosomas no sangue. Na segunda, um gatinho de 4 dias de idade infectou-se pela picada de 13 larvas de *T. megista* (exame positivo 8 dias depois). Obteve 3º resultado positivo em cobaia sugada por 7 barbeiros adultos, na qual encontrou fórmas parasitarias no musculo cardiaco ao exame histologico, tendo a infecção sanguinea sido inaparente. Esta experiencia durou de 30-VI-13 a 8-IX-13.

Torres não encontrou flagelados na cavidade celomica de triatomas infectados, nem nas glandulas salivares. Nestes orgãos, como já o dissemos, B. Barreto, citado por M. da Cunha, encontrou fórmas parasitarias.

Além das experiencias de Chagas e de Torres não se acham na literatura mais referencias a resultados positivos obtidos pela propria picada do *T. megista*. Nossas experiencias e seus resultados serão dados adiante.

A transmissão pelas dejeções foi primeiro constatada por Brumpt (1912), que colocou fézes de *T. megista* infectadas na mucosa ocular de um macaco (*Cercopithecus ruber*), depois na mucosa bucal e retal de camondongos nóvos (1913). Mais resultados positivos por contaminação por parasitos das dejeções através as mucosas ilésas foram obtidos por Mayer e Rocha Lima, Neiva, Torres etc., recentemente por nos mesmo (1932) e Kofoid e Donat (1933). A penetrabilidade de fórmas infectantes do *S. cruzi* através a péle intácta de camondongos brancos recenascidos (de 2 dias de idade) foi verificada por Brumpt (1913), deixando os animais suspensos em atmosfera humida durante 3 horas para evitar a dissecação das dejeções: obteve 1 resultado positivo em 11 camondongos experimentados.

Nossas primeiras experiencias de transmissão são as seguintes, já em parte publicadas (1932):

A)—Por picada: Utilisámo-nos de exemplares adultos de *T. megista* que haviam sugado 25 dias antes uma cobaia no 40° dia de infecção, mas provavelmente infectados desde muito mais tempo.

Foram alimentados em 3 cobaias:

n° 1—370 gr.—sugada por 3 barbeiros
n° 2—475 gr.—sugada por 2 barbeiros
n° 3—445 gr.—sugada por 2 barbeiros.

Os animais eram amarrados de barriga para cima sobre uma prancha e colocados em um canto menos iluminado do laboratorio, sendo as experiencias feitas com 1 animal de cada vez. Soltávamos os insétos perto dele e assistiamos á sucção: os barbeiros ficavam sobre a prancha, em contáto com a cobaia sómente pela tromba. Esperavamos que terminassem a refeição (que ás vezes era interrompida por bruscos movimentos, mas logo recomeçada) após a qual os hematofágos procuravam afastar-se, sendo então recolhidos. Nestas experiencias nenhum barbeiro defecou durante ou imediatamente após a sucção.

B)—Por deposição de dejeções hialinas sobre a péle.

A técnica empregada foi a seguinte: As cobaias eram amarradas, barriga para baixo, e os pêlos de pequena região dorsal cortados á tesoura não muito rente; aí colocavamos o liquido infectante, esperando até que secasse completamente, o que requeria alguns minutos. A região dorsal, proxima da nuca, não podia ser lambida pelo animal depois de solto, evitando-se assim a possibilidade da contaminação pela mucosa digestiva—possibilidade essa aliás duvidosa depois do secamento. Nenhuma precaução foi tomada para evitar a dessecação natural.

Foram submetidas á experiencia 3 cobaias:

nº 4—470 gr.—Foi depositada sobre a péle 1 pequena gota limpida, proveniente da 4a. eliminação de um dos barbeiros que sugaram a cobaia nº 1; 1 hora depois foi pósta nova gota, de um inséto que sugou a cobaia 2.

nº 5—410 gr.—foram depositadas, a intervalos, 5 gotas de urinas eliminadas pelos triatomas que se alimentaram nas cobaias nº 1, 2 e 3.

nº 6—380 gr.—servimo-nos do 2º liquido eliminado por um dos barbeiros da cobaia nº 2, que continha numerosos parasitos e ligeiros traços de fézes. Em menos de 15 minutos havia secado.

C)—Por deposição do liquido hialino sobre a mucosa ocular: Cobaia nº 7, 780 gr.—Instilámos em um dos ólhos uma pequena gota do mesmo liquido que servíra para a cobaia n.º 6.

— O exame a fresco do sangue da cobaia n.º 7 foi feito diariamente, antes de começarmos a examinar o sangue das outras (o que deveriamos ter feito). O 1º exame positivo da cobaia 7 foi obtido 16 dias depois da instilação no globo ocular; neste dia examinámos o sangue de todas as outras, com o seguinte resultado: Positivo, cobaias nº 4 e 5; negativo, cobaias nº 1, 2, 3, e 6. O animal no sangue do qual os tripanosomas eram mais numerosos nesse dia, era a nº 5. No 18º dia a cobaia nº 6 teve o 1º exame. positivo. As cobaias nº 1, 2 e 3 foram examinadas, sempre com resultados negativos, até 1 mês depois que as outras apresentaram parasitos no sangue, continuando em observação depois da publicação desta parte das experiencias, com os resultados que agora daremos.

Nessa mesma ocasião fizemos uma tentativa de transmissão por picada em condições muito especiais: a cobaia nº 3 foi sugada novamente ao fim de 8 dias por 1 triatoma adulto (*T. megista*) que havia sido inoculado na cavidade geral com dejeções hialinas muito ricas em tripanosomas metaciclicos, 8 dias antes, quér dizer, no mesmo dia em que foram iniciadas as experiencias e com liquido dos barbeiros que sugaram as cobaias 1, 2 e 3.

Todas as cobaias foram conservadas na mesma gaiola, separadas de outros animais, durante os primeiros 18 dias de observação, tendo sido então retiradas as infectadas.

Em resumo, os resultados que demos anteriormente foram que 3 cobaias adultas foram sugadas por 8 *T. megista* alados (um dos quais havia sido 8 dias antes inoculado com fórmas infectantes na cavidade geral), nenhuma tendo se infectado. Dejeções hialinas desses mesmos barbeiros foram infectantes para 1 cobaia através a mucosa ocular e para 3 cobaias adultas através a pele normal.

Os resultados das observações e experiencias que se seguiram a estas conclusões são os seguintes:

Cobaia n.º 1—Esta cobaia, além de ter sido sugada por 3 barbeiros em 11-VII-32, foi sugáda novamente por

3	T.	megista,	em	14-X-32
6	„	„	„	1-XI-32
3	„	„	„	1-XII-32
4	„	„	„	12-XII-32
5	„	„	„	14-XII-32
11	„	„	„	17-XII-32

Em 6 mêses alimentou, portanto, 35 barbeiros infectados. Dos 11 que a sugaram em 17-XII-32, 2 haviam sido inoculados no celôma, 5 dias antes, com urina infectada de *T. megista*.

Esta cobaia foi observada de 11-VII-32 a 27-I-33, tendo tido ao todo 50 exames a fresco de sangue negativos. Para contrôle positivo, procurámos infecta-la através a péle com dejeções, em 20-I-33, mas o animal morreu em 29-I-33 antes que o resultado pudesse ser verificado. O coração foi examinado microscopicamente, não tendo sido encontradas fórmas de multiplicação do *S. cruzi*. Em resumo, 1 cobaia picada por 35 exemplares adultos de *T. megista* infectados, não adquiriu a infecção.

Cobaia nº 2—Picada por 2 triatomas em 11-VII-32 teve exames negativos até 5-IX-32. Em 6-IX-32 puzemos liquido hialino infectado sobre a péle, continuando os exames negativos até 12-X-32. Em 13-X-32 tentámos novamente a infecção através a péle intacta, obtendo exame positivo em 24-X-32, tendo tido ultimo exame negativo em 20-X-32. Este animal morreu em 18-XII-32, com ultimo exame positivo em 13-XII-32. «Uma cobaia não se infectou por duas picadas de *T. megista* infectados; a tentativa de infecção através a péle falhou uma vez, tendo sido conseguida em outra».

Cobaia n.º 3— Sugada em 11-VII-32 por 2 adultos infectados e em 19-VII-32 por 1 triatoma infectado e inoculado na cavidade geral com fórmas metaciclicas, foi esta cobaia ainda submetida ás seguintes provas: Em 13-X-32 foi colocado liquido infectante sobre a péle (exames negativos até 24-XI-32, em numero de 39); em 13-XII-32 foi inoculada no peritonio com conteúdo intestinal de ninfa infectada, (ex. neg. até 13-I-33). Nesta data (peso 660 gr.) foi inoculada com sangue de uma cobaia infectada pelo *S. cruzi*, tendo tido exames negativos até 2-I-33 e 1.º resultado positivo a 25-I-33. A infecção foi verificada até 1-III-33, tendo desaparecido os parasitos do sangue em 6 e 13-III-33.

A cobaia n.º 3 não se infectou pela picada de 3 *T. megista* infectados (um dos quais inoculado na cavidade geral), nem pela deposição de dejeções limpidas sobre a péle; mostrou-se infectada 41 dias depois de injetada no peritonio com intestino de barbeiro parasitado e 10 dias de-

pois de inoculada com sangue de cobaia infectada. Teve reação de Machado fracamente positiva em 17-II-33.

Cobaia n.º 4 — Infectada através a péle, em 11-VII-32. Exames positivos de 27-VII-32 a 22-IX-32, negativos de 4-X-32 a 13-V-33 (6 exames). Em 8-V-33 foi inoculada subcutaneamente com sangue de cão (raça de tatú); exame positivo 19-V; de 22-V a 29-IX-33 teve 24 exames negativos. Reação de Machado positiva em 2-VI-33. Este animal ainda vive (24-XI-33), não tendo tido depois mais exames positivos (v. pag. 32).

Cobaia n.º 5— Infectada pela péle em 11-VII-32, adquirindo infecção mortal (30-VIII-32).

Cobaia n.º 6 — Infectada pela péle, ex. pos. 29-VII-32 (liquido na péle em 11-VII). De 2-VIII-32 a 13-XII-32 teve 12 exames negativos. Infecção benigna, fugaz.

Cobaia n.º 7—Infectada pela mucosa ocular (11-VII-32); ex. pos. de 27-VII a 24-X-32; ex. neg. 10-XI-32. Em 13-XII-32 foi inoculada com conteúdo intestinal de ninfa infectada (que serviu para a cobaia nº 3): exames neg. até 4-I-33 (10 exames). Em 27-I-33 estava bastante infectada; morreu em 6-II-33 (V. pag. 32).

Temos ainda as seguintes observações de cobaias picadas por Triatomas infectados (*T. megista*, adultos):

a) — 2 cobaias sugadas por varios T. (5 ou 6) em 9-VI-33 e que não defecaram sobre as mesmas. Foram examinadas regularmente, com resultados negativos, morrendo uma em 18-IX-33 e outra em 22-IX-33. Exame microscopico do coração de ambas, negativo.

b)—cobaia sugada por 4 T. em 23-V-33. Até Novembro teve sempre exames negativos, estando ainda viva.

c)—2 barbeiros foram alimentados em 1 cobaia, em 2-VI-33; até agora (I-934) não teve infecção aparente. Vive.

d)—1 barbeiro sugou 1 cobaia, sendo suas dejeções inoculadas em outra, em 10-VI-33. A que foi sugada não teve a infecção, morrendo em 27-X-33 (coração sem leishmanias); a inoculada com as dejeções tinha tripanosomas no sangue em 29-VI-33.

e)—Cobaia na qual foram alimentados 4 T. em 3-VII-33, morreu em 12-X-33. Sangue sempre negativo: coração livre de leishmanias.

f)—8 barbeiros sugaram 1 cobaia em 25-VIII-33. Exames negativos quasi diarios até 30-XII-33. Em 2-I-34 foi picada por mais 14, continuando com exames negativos ate 25-I-34.

g)—Cobaia picada por 3 T. em 20-IV-33.
„ „ „ 4 „ „ 23-V-33
„ „ „ 2 „ „ 2-VI-33

Estas cobaias ainda vivem, não infectadas.

h)—Infecção durante o áto da picada, por contaminação pelas fézes: uma cobaia foi sugada por varias ninfas em 10-IV-33, tendo as dejeções escorrido pelas paredes dos tubos que as continham e atingido a pêle do animal através a gaze. O 1.º exame de sangue foi feito 17 dias depois, positivo.

i)—Uma cobaia adulta foi sugada em 8-V-33 por 1 *T. megista* que havia sido inoculado no celoma com metaciclicos 13 dias antes. Depois foi sugada por mais triatomas naturalmente infectados e não inoculados.

Em 3-VIII-33 por 10 *T. megista*
„ 12-VIII-33 „ 5 „ „

Teve numerosos exames negativos até 25-IX-33; neste dia foram colocados em seus olhos dejeções de barbeiro infectado. Os exames foram negativos até 7-X-33 e positivo a 9 do mesmo mês. O animal morreu infectado em 7-XI-33. Não se infectou pela picada de 16 *T. megista* infectados pelo *S. cruzi*, um dos quais inoculado com fórmas infectantes na cavidade geral, tendo depois adquirido uma infecção mortal quando 1 vez foram colocadas excreções nas mucosas intactas dos olhos.

— Em algumas experiencias que fizemos obtivemos tambem facilmente infecções de camondongos brancos adultos, pondo gôtas de dejeções limpidas de *T. megista* infectados sobre a péle. Os pêlos não eram aparados nem raspados, não havendo tambem tomado precauções para retardar o dessecamento, sendo o liquido posto numa das regiões inguinais. Em 4 experiencias o periodo de incubação variou de 9 a 13 dias.

Um camondongo infectou-se por via gastrica (incubação 15 dias).

Não conseguimos infectar 2 ratos pela deposição de excreções sobre a péle nem fazendo 1 rato comer 1 triatoma, mas este animal não se presta para estas experiencias.

A infecção de camondongos brancos colocando-se sangue de animal infectado sobre a péle intacta não foi por nós conseguida (2 experiencias).

A respeito da penetrabilidade do *S. cruzi* através os tegumentos ilésos, verifica-se, como no *T. lewisi*, uma maior capacidade de penetração das fórmas parasitarias infectantes do inséto (metaciclicas) do que as do sangue. No caso do *T. lewisi* as fórmas metaciclicas penetram pelas mucosas facilmente, ao passo que as fórmas sanguicolas não o fazem (ver B. Borghi, 1932); No caso do *Schizotrypanum*, os tripanosomas têm maior poder de penetração; as fórmas sanguicolas passam por certas mucosas de modo mais ou menos constante (Brumpt, Mayer e Rocha Lima,

Nattan-Larrier), e as metaciclicas as atravessam facilmente, bem como á péle normal de camondongos recemnacidos (Brumpt) e de cobaias e camondongos adultos (Dias). A passagem das fórmas sanguicolas do *S. cruzi* através a péle não foi tambem verificada por Mayer e R. Lima (1914) nem por Nattan-Larrier (1921).

Esta propriedade dos metaciclicos mostra sua adaptação ao modo de transmissão do flagelado e á vida parasitaria. É provavel que estas fórmas sejam exclusivamente adaptadas á transmissão da infecção ao Vertebrado, incapazes de evoluir em outro inséto e no mundo exterior, por não terem a propriedade de se multiplicar nem de se transformar novamente em critídia.

Em vista dos resultados experimentais que temos exposto a transmissibilidade do *S. cruzi* pelas fórmas parasitarias das dejeções, através de tegumentos intactos, tem sido um fáto muito mais vezes verificado que o da transmissão pela propria picada. A raridade que constitue o achado de fórmas de tripanosomas nas glandulas salivares e na cavidade geral fala ainda a favor de que a propagação da infecção pela picada é um fáto excepcional (Brumpt).

Nos raros casos em que se tem conseguido a transmissão pela picada, não poderá a mesma ser devida ás fórmas que no estomago do barbeiro permanecem por muito tempo, infectantes?

A verificação da possibilidade de um regurgitamento durante o áto da picada, pelo qual o conteúdo do estomago poderia em parte atingir as porções anteriores do stomodéum, tornaria muito provavel esta hipotese. A constatação dessa possibilidade seria um fáto biologico de grande importancia no estudo da transmissão dos Tripanosomídas; aliás, a realidade das fórmas infectantes do estomago, por nós demonstrada, póde servir de base a considerações teóricas muito interessantes a este respeito.

Estas fórmas poderiam ser interpretadas como um vestigio do módo de transmissão inicial do *Schizotrypanum*, porquanto são fórmas não evoluidas, infectantes, derivadas diretamente das fórmas sanguicolas ingeridas; a transmissão primitiva seria mecanica, ou aciclica, e teria passado, pela adaptação progressiva do flagelado ao Invertebrado, á evolução na porção posterior e ao metodo contaminativo de transmissão. Nos Tripanosimídas em geral, a evolução na porção anterior do tubo digestivo denota pouca adaptação, ou antes, recente adaptação ao Invertebrado, traduzindo a evolução na porção posterior uma adaptação mais estrícta, existindo gradações entre um e outro típo de evolução no transmissor[10]. O *S. cruzi* seria um flagelado que, atualmente bem adaptado á trans-

[10] Ver Adler, 1933 e Hoare & Coutelen, 1933.

missão por contaminação, apresentaria ainda no seu ciclo reminicencias de sua evolução e metodo de propagação iniciais. Não devemos avançar tanto no dominio das considerações téoricas; queremos apenas deixar esboçadas levemente algumas idéas, que mostram a nossa tendencia a adotar a doutrina de Minchin sobre a origem dos tripanosomas, segundo a qual o hospedador inicial seria o Vertebrado.

Em resumo, os resultados de todas as nossas experiencias sobre a transmissão do *S. cruzi*, de seu vectôr natural ao animal de laboratório, pela picada e por meio das dejeções, são os seguintes:

Nas tentativas de transmissão por picada, fizemos 104 *T. megista* infectados, na fáse adulta quasi todos, sugarem 14 cobaias, sem termos em nenhum caso observado a infecção do animal.

Pela deposição de dejeções limpidas de barbeiros infectados, sobre a péle intacta, obtivemos a infecção em 4 cobaias e 5 camondongos adultos, com 2 resultados negativos em cobaia e 1 em camondongo. Em 12 experiencias tivemos portanto 9 resultados positivos. A infecção através a mucosa ocular foi conseguida em 3 cobaias e pela mucosa digestiva em 1 camondongo, não havendo experiencias negativas.

V) — Cultura in vitro e na cavidade geral do T. megista.

Sumário: Cultura — aparecimento das fórmas metacíclicas, infectividade; inoculações em camondongos e infecção peritonial; isolamento do parasito do inséto. Cavidade geral: inoculação de fórmas do sangue; inoculação de fórmas do inséto. Conclusões.

Cultura

O *S. cruzi* cultiva-se facilmente (Chagas). Sobre sua evolução *in vitro*, que é análoga á do inséto (Chagas), não entraremos em detalhes. Assinalaremos fátos esparsos que temos observado.

O aparecimento das fórmas metaciclicas nem sempre é facil de ser verificado, parecendo-nos que de regra começa a se dar entre o 7.º e 9.º dia. Segundo Galliard (1929) em certas condições dar-se-ía mesmo antes (5 dias).

Observa-se nas culturas fáto semelhante ao que assinalámos no barbeiro, a saber, permanecem no tubo tripanosomas sem sinais de evolução ou de degeneração até varios dias, até 8 pelo menos. Chamaram a atenção para este fáto M. e Mme. Delanoe (1912), que viram tripanosomas inalterados até 4 e 5 dias depois de semeados. Esta circunstancia, com-

preende-se, dificultará sem duvida a próva de que os metacíclicos possam se formar muito precocemente (5 dias).

Outro fáto que tambem observámos nas culturas, depois de o termos constatado no estomago do *T. megista*, foi o de que dentre os tripanosomas sanguicolas semeados muito raros pódem, ainda sob seu aspéto morfológico caracteristico, mostrar sináis de divisão, como duplicidade de nucleo, de flagelo, etc., algumas horas depois de serem semeados.

Não fizemos experiencias para verificar a infectividade das culturas, mas, pelos resultados de inoculação de barbeiros e pelos fátos análogos de evolução que se observam *in vitro* (permanencia de fórmas de blefaroplasto posterior durante alguns dias, durante o tempo bastante para que as fórmas metaciclicas começem a aparecer), quasi poder-se-ía garantir que as inoculações são positivas desde as primeiras horas até muitos dias. Aqui tambem a infectividade sería a princípio devida ás fórmas sanguicolas não evoluidas e depois aos metacíclicos.

A infectividade permanente das culturas, assim, não poderá demonstrar a infectividade de todas as fórmas evolutivas do *S. cruzi*.

A respeito da questão da infectividade das fáses evolutivas das culturas as opinões são divergentes. Segundo Torres (1922) todas as fórmas de evolução seriam infectantes para o Vertebrado, baseado em que inoculações de culturas recentemente semeadas transmitem a infecção quando inoculadas. Entretanto H. Galliard (1929) contra esta demonstração argumentou que o aparecimento precóce dos metaciclicos constitue causa de erro difícil de afastar; de outro lado, a circunstancia a que já nos referimos, da persistencia de tripanosomas inalterados no meio de cultura (que Galliard aliás acha pouco provavel) impede a interpretação dos resultados das inoculações, que com certeza serão positivos.

Segundo W. Nöller (1920), nas culturas de tripanosomas, só as fórmas metacíclicas são infectantes. Além destas, a nosso ver, temos que considerar fórmas mais ou menos modificadas, derivadas dirétamente das do sangue (leishmanias?), que no caso do *S. cruzi* existem no estomago do hematófago e que com muita probabilidade ocorrerão tambem na evolução *in vitro*.

A infectividade das culturas do *S. cruzi* já foi verificada depois de muito tempo, através numerosas passagens. Nöller (1931) refere que Nöller e Haupt observaram a presença de parasitos no sangue de camondongos injetados com amostra de uma cultura que em 7 anos sofrera 79 passagens.

Na seção de Protozoologia do Instituto existe uma amostra de *S. cruzi* (raça humana) atualmente com mais de 110 passagens em meio de

Noguchi, feitas em média cada 25 dias; a cultura original foi obtida em 1927.

Com um tubo desta cultura (110a passagem, ultima repicagem em 24-IV-33) inoculámos em 13-V-33 tres camondongos brancos adultos, com 1 a 2 cc. de meio semi-sólido cada um. 2 dos animais morreram pouco tempo depois; o restante teve exames negativos quasi diários até 8-VI-33, tendo nós visto 1 tripanosoma no seu sangue em 12-VI-33. Inutilmente procurámos tripanosomas, desde o dia seguinte, no sangue periférico deste camondongo, até 18-VII-33. Morreu em 15-VIII-33, ainda negativo.
Ou a infecção foi muito ligeira e fugaz (1 exame positivo) ou, o que é pouco provavel, houve tróca de animais.

A inoculação desta mesma amostra em cobaia, depois de mais 2 ou 3 repicagens, foi negativa.

Inoculando culturas recentes e virulentas em camondongos brancos, não pudemos verificar a invasão precóce e intensa da cavidade peritoneal pelos parasitos, tal como foi descrita por H. Galliard (1929).

Pelo quadro abaixo vemos que nestas experiencias o aparecimento de tripanosomas no sangue precedeu o do peritoneo, nos animais injetados sob a péle.

Inoculações feitas em 24-VIII-33:

QUADRO 10

Nº. do animal, ponto de inoculação, quantidade inoculada		Resultados											
		VIII–33					IX						
		25	26	28	29	30	1	4	8	11	16	19
Camondongo 1	S	−	−	−	+	+	+	++	+	†		
Pele do abdomem. ½ cc.	P	−	−	−	−	−	+	+	++			
	Pc	−	−	−	−	−	+	+				
Camondongo 2	S	−	−	−	+	+	+	++	+	·	+	+
Peritonio 1 cc.	P	−	−	+	+	+	+	++	+	·	+	+
	Pc	−	+	+	+	+	+	+	·	·	+	+
Camondongo 3	S	−	−	−	+	+	+	++	+	+		†
Pele do dorso. 1,5 cc.	P	−	−	−	−	−	+	+	+	+		
	Pc	−	−	−	−	−	+	+	·	·		
Camondongo 4	S	−	−	−	+	+	+	++	++	†		
Pele do dorso. 1 cc.	P	−	−	−	−	−	+	++	++			
	Pc	−	−	−	−	−	+	+	·			

S–sangue, P–peritonio, Pc–peritonio (corado).

Os camondongos foram inoculados com cultura de *S. cruzi*, raça de tatú, meio de Noguchi, 17 dias depois de semeada (sangue de cão infectado).

Nos frottis do material injetado foram encontrados poucos metacíclicos.

No dia 26 os parasitos encontrados nos esfregaços corados do camondongo 2 eram fórmas arredondadas, intracelulares. Todos os outros sinais positivos indicam fórmas de tripanosoma extracelulares. As primeiras fórmas a aparecer no sangue foram as fórmas finas (jovens).

A infecção foi rapidamente mortal nos camondongos inoculados subcutaneamente; o injetado no peritonio ainda vive, já com exame negativo do sangue (28-XI-33).

—Em alguns casos, depois de estabelecida a infecção sanguinea, é mais facil encontrar-se flagelados no liquido peritoneal que na circulação, mas deve-se considerar que é muito maior a diluição dos parasitos na torrente circulatoria que no exsudato peritoneal. Ao decair da infecção sanguinea os tripanosomas pódem ser achados no peritoneo e serem inaparentes no sangue.

—Por duas vezes tentámos isolar o *S. cruzi* diretamente do tubo intestinal do *T. megista*, pelo processo de sementeiras em placas com agar-sangue (Nöller), não tendo conseguido.

—Semeando tubos de Noguchi com dejeções hialinas de barbeiros contendo grande quantidade de fórmas metaciclicas, observámos a diminuição progressiva das mesmas, até seu desaparecimento completo.

Na maioria das vezes ha contaminação do meio, a qual não permite que a observação se prolongue por muitos dias; não obstante consegue-se acompanhar os tripanosomas até 3 e 4 dias depois de semeados, conservando os mesmos sua mobilidade. Em um tubo vimos fórmas metaciclicas até o 3º dia, desaparecendo depois sem que tenha havido contaminação; o tubo permaneceu esteril e sem parasitos por longo tempo.

Para se fazer estas experiencias em bôas condições deve-se separar o inséto depois de se alimentar em placa esterilisada, esperando-se que elimine 1 ou mais vezes excreções limpidas para depois fazerem-se com elas as sementeiras.

Embora não tenhamos conseguido culturas com este material, é provavel que se possam obter quando haja critidias em mistura com os metaciclicos, o que acontece quasi sempre embora sejam elas em numero geralmente muito menor.

Parece que á fórma metaciclica do *S. cruzi* não é cultivavel, apenas sobrevivendo por alguns dias nos meios de cultura.

Evolução na cavidade geral do *T. megista*.

Sobre este assunto temos uma publicação anterior (1932) em que

referimos as nossas primeiras experiencias que serão agora novamente expostas, seguidas de outras que ainda não foram publicadas.

Com o fim de verificar o que se passava com o *S. cruzi* na cavidade geral do inséto transmissor, quando aí artificialmente introduzido, inoculámos exemplares adultos de *T. megista* a principio com fórmas sanguicolas e depois com fórmas metaciclicas deste parasito provenientes de dejeções infectadas.

Nas primeiras experiencias servimo-nos de parasitos obtidos do sangue de um cão bastante infectado, pouco antes da morte (19º dia, raça de tatú).

Para que o material a ser injetado contivesse muitos parasitos em volume pequeno e fosse o mais possivel livre de outros elementos, faziamos a centrifugação do sôro, após a coagulação do sangue do cão colhido por punção cardiaca. Pequena quantidade de liquido era então injetada na hemocéle de triatomas adultos por meio de seringa graduada em centésimos e munida de agulha fina.

Fazemos a inoculação pela face ventral do inséto, ao nivel de uma das ultimas articulações dos aneis abdominais, a igual distancia da linha mediana e do conexivo. A agulha deve ser mantida obliquamente de trás para diante, e penetrar pouco de maneira a ser evitada a lesão dos orgãos internos do Hemiptero, o qual deve estar com o estomago bem vasio.

A quantidade de liquido injetada deverá ser pequena, não tendo excedido a 0,15 c.c. nas nossas experiencias. As diversas operações de sangria do animal, enriquecimento dos tripanosomas e inoculação deverão ser feitas nas melhores condições possiveis de assepsía: algumas vezes tem-nos ocorrido o fáto de morrerem insétos pouco tempo depois de inoculados apresentando numerosas bacterias na hemolinfa, tendo desaparecido os parasitos.

Nos barbeiros sacrificados 24 horas depois da injeção o exame a fresco do liquido celomico mostra tripanosomas com seu movimento habitual, o mesmo se observando depois de 48 horas. A este tempo as modificações morfologicas dos parasitos não vão além do alongamento transversal do blefaroplasto e de sua aproximação do nucleo; encontram-se muitos tripanosomas não modificados, não tendo sido observadas, então, leishmanias nem fórmas intracelulares.

No 7º dia a hemolinfa apresenta flagelados com aspectos diversos: critidias de diferentes dimensões, corpusculos leishmaniformes e parasitos de blefaroplasto posterior (ainda proximo ao nucleo) e de nucleo alongado; entre estas fórmas e as de critidia notam-se estádios intermediarios. Tanto as leishmanias como as critidias podem mostrar sinais de divisão.

Ao lado destas fórmas livres, móveis ou imóveis, encontram-se na linfa parasitos arredondados englobados por alguns dos seus elementos celulares; as leishmanias não são numerosas dentro de cada celula e parecem não se multiplicar, apresentando-se com aspecto normal ou um pouco alterado.

Em todas as nossas experiencias o liquido celomico foi colhido com todo o cuidado para não se ferir o tubo intestinal: cortavam-se as pernas do hemiptero junto á inserção e procedia-se a delicada expressão de seu abdomen, caso o liquido não brotasse espontaneamente como em geral se observa. Nunca encontrámos em mistura com a linfa assim colhida vestigios de conteúdo intestinal.

Em dois barbeiros sacrificados ao fim de 2 e 7 dias as glandulas salivares, examinadas em córtes, estavam livres de parasitos.

Por esta experiencia foi visto que a fórma sanguicola do *S. cruzi* é capaz de se desenvolver quando introduzida na cavidade geral do barbeiro.

Esta parte de nossas pesquizas a respeito já havia sido publicada, devendo ser procurada essa publicação para melhor esclarecimento do que descrevemos por causa das ilustrações que a acompanham e que não serão aqui reproduzidas.

— No dia 25-XI-31 foi colhido sôro sanguineo de um cão infectado (raça humana), e inoculado após centrifugação na cavidade celômica de 4 *T. megista* adultos (3 femeas e 1 macho).

Em 2-XII-31 só estava viva 1 femea que foi alimentada em cobaia normal, tendo eliminado dejeções infectadas. O triatoma foi sacrificado em 10-XII-31, 15 dias depois de inoculado e 8 dias após a ultima refeição.

A hemolinfa não continha flagelados ao exame a fresco, apresentando-se rica em celulas, sem bactérias. Pelo exame do vaso dorsal dissociado em agua fisiologica encontrámos alguns flagelados móveis.

Exame dos esfregaços (acido ósmico, alcool absoluto; Giemsa): Em 2 preparados de hemolinfa só encontrámos 1 critidia livre, atipica. Vaso dorsal: fórmas arredondadas parecendo alteradas. Ovario: 1 celula com 2 leishmanias em degeneração; 1 leishmania livre; varias critidias perfeitas ou em transição para metaciclico, algumas mais ou menos alteradas; metaciclicos muito finos; critidias e leishmanias parecendo em degeneração avançada; algumas celulas com parasitos apenas reconheciveis.

Na lamina obtida esfregando a face interna da folha dorsal do abdomen encontrámos uma celula com 4 parasitos, entre os quais uma fórma parecendo em transição para metaciclico; celula com fórmas monstruósas arredondadas; metaciclico muito delgado.

Frottis da lamina ventral do abdomen: acham-se com facilidade metaciclicos finos bem corados, critidias delgadas e fórmas intermediarias.

As glandulas salivares não foram examinadas. Na pequena gota colhida na extremidade da tromba do inséto ao ser sacrificado, não foram encontrados parasitos.

Verifica-se por esta experiencia que os tripanosomas sanguicolas inoculados na cavidade geral do *T. megista* evoluem até á fórma metaciclica final. Flagelados deste tipo permanecem vivos até 15 dias depois da inoculação, ao lado de critidias e outras fórmas. As leishmanias quasi sempre mostram sinais de degeneração, parecendo não haver, de regra, evolução intracelular; o desenvolvimento, para o qual as condições não parecem ser ótimas, é analogo ao do *Schizotrypanum* em cultura ou no tubo digestivo do inséto. Difére um pouco da evolução cultural pelo aparecimento mais tardio das primeiras transformações evolutivas, sendo em ambos necessario o mesmo prazo para a formação dos primeiros tripanosomas metacíclicos (7-9 dias).

A hemolinfa do *T. megista* não é nociva á fórma sanguicola do *S. cruzi*, permitindo sua sobrevivencia e evolução quando introduzida na cavidade geral. Os fenomenos degenerativos ocorrem em varias fases da evolução no celôma, sendo bastante frequentes ao fim de alguns dias.

A invasão da cavidade geral dos insétos infectados nunca foi em condições naturais por nós observada.

Seguindo a mesma técnica das experiencias precedentes e com o mesmo fim, fizemos tambem inoculações na cavidade geral de dejeções hialinas ricas em flagelados.

1)—Barbeiro adulto inoculado em 11-VII-32 (com liquido eliminado por um dos insétos que sugou a cobaia 1). Foi alimentado na cobaia 3, 8 dias depois de inoculado, não transmitindo a infecção. Foi sacrificado em 22-VII-32 (11 dias): exames a fresco de linfa, vaso dorsal, ovarios, glandulas salivares negativos, não tendo sido tambem encontrados parasitos em esfregaços corados (v. experiencias de transmissão).

2)—Exemplar adulto inoculado com dejeções e sacrificado 6 dias depois. Nos *frottis* de varios orgãos (ovarios, vaso dorsal, tecido adiposo) encontram-se tripanosomas, critídias de fórmas variadas e tipos de transição. Predominam os tripanosomas metaciclicos, que são de diversas dimensões. Critídias em divisão. Aglomerados parasitarios em que os metaciclicos são mais numerosos que as critídias; num deles os parasitos formavam uma rosácea, dispondo-se com os flagelos voltados para a periferia. Encontrámos fórmas de divisão interessantes, parecendo mistas de critídia e metaciclico; este fáto indicaria a possibilidade da transforma-

ção em metaciclico durante o processo de divisão de critídias. Em uma destas fórmas o corpo era unico, provido de 1 flagelo, e em outra as duas extremidades eram flageladas:

— Não encontrámos parasitos intracelulares, leishmanias, nem fórmas metaciclicas tipicas em divisão. Póder-se-á supôr que as critídias existentes no liquido inoculado tenham se multiplicado e se transformado em metaciclicos; muitas destas fórmas inicialmente inoculadas teriam permanecido vivas. Possivelmente os ovarios são orgãos de predileção dos parasitos inoculados na cavidade geral, pela maior quantidade de flagelados que apresentam.

3)—Triatoma inoculado, sacrificado no 11.º dia: nos *frottis* de ovarios, hemolinfa e tecido adiposo não foram achados parasitos.

4)—Foram inoculados 3 adultos em 12-XII-32. Um, sacrificado 48 horas depois, não tinha tripanosomas na hemolinfa nem no vaso dorsal, ao exame a fresco, não tendo sido tambem achados nas laminas coradas (tecido adiposo, vaso dorsal, linfa, ovarios, glandulas salivares). Os dois restantes sugaram a cobaia n.º 1 em 17-XII-32 juntamente com outros barbeiros, com resultado negativo (v. experiencias de transmissão); um deles, sacrificado nesse dia, não tinha flagelados na linfa nem nos orgãos. O outro perdeu-se.

5)—Em 29-XII-32 foram inoculados 2 *T. megista*, um logo depois de se alimentar, outro com o estomago vasío: O primeiro, sacrificado 24 horas depois, tinha alguns flagelados na linfa, examinada a fresco. *Frottis*: linfa: tripanosomas não alterados (contámos 35 em 3 laminas) e nenhuma critídia, (numa lamina preservada do liquido inoculado contámos, em 300 flagelados, 5 critídias e 295 metaciclicos, portanto 98,3 % de metaciclicos). 2 metaciclicos estavam unidos a celulas mononucleadas por uma das extremidades (inicio de fagocitóse?); não havia fórmas intracelulares nem leishmanias livres. Ovarios: só achámos 1 metaciclico, extracelular. Glandulas salivares, tecido adiposo, vaso dorsal, negativos.

O barbeiro sobrevivente foi sacrificado depois de 48 horas. A fresco, linfa e glandula salivares negativas. *Frottis*: linfa: foram vistos 6 metacíclicos, quasi todos bastante alterados mas sem sinál de divisão ou regressão evolutiva; tripanosomas presos a celulas mononucleadas pequenas. Raras critídias livres vacuolizadas, uma das quais presa a um leucocito. Fórmas de classificação incerta, de blefaroplasto arredondado imediatamente atrás ou ao lado do nucleo, fórmas de transição cujo sentido de transformação não se póde garantir mas que parecem ser originadas de critídias. Glandulas salivares, ovarios, vaso dorsal e tecido adiposo, negativos.

6)—4 *T. megista* adultos, 3 femeas e 1 macho, inoculados em 11-I-33.

Após 48 horas foram dissecados o macho e 1 femea, nos quais o exame da hemolinfa e dos ovarios desta foram negativos. Os outros dois alimentaram-se muito pouco em 17 e bastante em 20-I-33, morrendo um deles em 2-II-33. O restante foi sacrificado no 22.º dia, sem tripanosomas na linfa nem no vaso dorsal ao exame a fresco. *Frottis* de ovarios, vaso dorsal, linfa, tecido adiposo, negativos. No ovario vi uma fórma suspeita, grande, talvez uma leishmania monstruosa. 2 tubos de Malpighi estavam repletos de flagelados, numerosas critídias de dimensões grandes e médias, metaciclicos e fórmas intermediarias. Nos *frottis* de glandulas salivares e esôfago havia numerosas hematias, entre as quais encontrámos 3 tripanosomas com a morfología das fórmas sanguicolas do *S. cruzi*, com certeza do sangue de um camondongo infectado que fôra sugado pouco antes de ser o inséto sacrificado.

7)—2 femeas foram inoculadas com pequena quantidade de urina limpida, infectada, em 25-IV-33. 4 dias depois uma foi dissecada, sem flagelados nos orgãos (inclusive glandulas salivares): A outra sugou cobaia normal em 8-V-33, morrendo mais de 30 dias depois da inoculação, tendo sido perdida. A cobaia sugada não se infectou (v. experiencias de transmissão, p. 84, i).

Estas experiencias tendem a demonstrar que os tripanosomas metaciclicos das excreções do *T. megista* não evoluem na cavidade geral deste inséto, quando aí injetadas. Devem ser entretanto retomadas estas pesquizas para que sejam averiguadas certas questões muito importantes, como sejam a capacidade de multiplicação ou de regressão a critídia, que os metacíclicos parecem não possuir. Nos casos em que ha evolução esta póde ser atribuida a fórmas de critídia, cuja inexistencia nas dejecões inoculadas não póde ser garantida. Parece que em alguns casos os metacíclicos degeneram na hemolinfa, sendo fagocitados pelas suas celulas. Como consequencia ou sinal de degeneração estas fórmas não poderão sofrer alterações morfológicas pelas quais se inicie a transformação em critídia?

— A técnica de inoculação de fórmas do *S. cruzi* provenientes do inséto ou do sangue de animal infectado, na cavidade celômica do Triatoma, constitui novo metódo de investigação das propriedades biológicas deste flagelado. Por ela foi verificada, além da capacidade de evolução do parasito sanguicola na hemolinfa do transmissor, a inexistencia de tropismo das fórmas evolutivas, particularmente dos metacíclicos, pelo aparelho salivar do barbeiro, bem como a não transmissibilidade da infecção pela picada dos insétos injetados.

As fórmas parasitarias do *Schizotrypanum* assinaladas nas glandulas salivares do *T. megista* em condições naturais (Chagas, Barreto), de-

verão provir de outras fases do desenvolvimento no hemiptero, e representam, segundo Chagas, o termo final do ciclo sexuado do parasito. Aos tripanosomas metacíclicos formados na ultima porção do intestino do barbeiro, aos quais é devida a infectividade das dejeções e que são os agentes da transmissão natural da infecção pelo método contaminativo, não nos parece ser possivel atribuir nenhum papel na transmissibilidade inoculativa do *S. cruzi*, nos casos em que seja realmente verificada.

VI) — **Pesquizas in natura.**

Sumário: Relatório de estadía em Lassance; isolamento do parasito do homem; animais com infecção natural; Schizotrypanum de morcegos.

— Fizemos quatro viagens a Lassance, duas em 1931[11] e duas em 1933, demorando-nos de cada vez cerca de 1 mês. Daremos apenas o relatório da nossa terceira estadía, de 21 de Março a 12 Abril deste ano, seguido de algumas observações.

O relatório que apresentámos ao Dr. Chagas em 18 de Abril de 1933 foi o seguinte:

Pesquiza de tripanosoma no sangue do homem e dos animais:

Exames a fresco:

Crianças:	62
Animais:	83
Total:	145

Idade das crianças:

0-2	anos	29 examinadas
3-5	„	15 „
6-10	„	15 „
11-15	„	3 „
Total		62

Animais examinados:

Morcegos	25
Cães	19
Gatos	27
Tatús	8
Coelhos	3
Preá	1
Total	83

[11] Em companhia do Dr. Carlos Chagas Filho.

Exames positivos:

Morcegos	5
Tatús	4
Cãis	2
Crianças	0
Gatos	0
Coelhos	0
Preá	0
Total	11

Inoculações: Com sangue de animais infectados foram inoculadas 11 cobaias, 1 cão e 1 sagui. Foram isoladas raças novas do *S. cruzi* do tatú e do cão.

Prosségue a identificação de um tripanosoma encontrado no sangue de morcêgos (*cruzi*?).

Excursões: Localidades percorridas—Santa Rita, Capão, Barreiro, Têlhas, Santa Maria, Capão d'Anta, Engenho Velho, Jaboticaba, Gentío (situadas nas circunvizinhanças de Lassance).

Numero de cafúas visitadas: 63, num percurso total de cerca de 30 léguas.

Foram capturados numerosos barbeiros no interior de habitações infestadas, na grande maioría *T. megista* na fáse ninfal e adulta (mais de mil), *T. sordida* e 1 exemplar femea de *T. geniculata* (que penetrára á noite, atraído pela luz).

Colhemos e examinámos numerosos percevejos (*Cimex lectularius*) de algumas cafúas, com resultado negativo.

Ambulatorio: Foram fichados 180 doentes.

———

A época em que foi realizada esta nossa excursão não foi favoravel ao encontro de casos agudos da doença de Chagas. Como se vê por este relatório, não achámos tripanosomas no sangue pelo exame a fresco de 60 crianças, quasi todos residentes em cafúas infectadas, suspeitas ou não da enfermidade. Segundo Chagas os casos agudos começam a aparecer em Setembro, sendo mais abundantes nos mêses quentes e depois diminuindo até ficarem muito escassos ou inexistentes.

Em geral examinavamos sómente 1 preparado a fresco, em condições nada propicias para um exame muito demorado. Encontrámos numerosos adultos e crianças com sináis tipicos de varias fórmas clinicas da enfermidade de Chagas, principalmente da fórma cardiaca.

Da ultima vez que lá estivemos trouxemos alguns doentes que foram internados no Hospital Oswaldo Cruz, no serviço do Dr. Villéla. Entre as inoculações de sangue de 6 doentes em cobaia, foram positivas 3, os quais todos tinham reação de Machado fortemente positiva. São doentes de fórma cardiaca do mal de Chagas (cujos nomes são Venancia, Edeltrudes e Augusto). Esta percentagem de resultados positivos de inoculações é a maior que tem se observado, em doentes cronicos daquela região.

—Das primeiras vezes que fomos a Lassance foram achados tambem com infecção natural, além de tatús e cãis, gatos. Todos estes animais já tinham sido encontrados na mesma região com infecção natural pelo *S. cruzi*, por Chagas e seus colaboradores.

A infecção natural do cão foi observada ha longo tempo por Chagas, referindo-se a ela Villela em 1924. Este fáto do parasitismo natural do cão foi tambem verificado na Argentina (S. Mazza, 1926) e no Panamá (Clark e Dunn, 1932).

Os cãis infectados que achámos em Lassance na nossa penultima viagem eram um adulto e outro ainda pouco crecído. Este (cafúa do Argemiro, Capão) morreu em poucos dias com numerosos tripanosomas na circulação; o outro morreu 3 mêses depois de encontrado, tendo tido exame de sangue negativo pouco tempo depois de trazido para o Rio.

—Inoculámos em cobáia 5 ninfas cheias de *Rhipicephalus sanguineus* colhidas sobre o cão da cafúa do Argemiro, com resultado negativo (ver Neiva, 1913).

Em cerca de 10 exemplares de mocós (*Cherodon rupestris*) que caçámos na Serra do Cabral (onde Brumpt e Gomes descobriram o *Triatoma chagasi* com infecção, atribuindo ao roedôr o papel de reservatório do virus na natureza), não encontrámos tripanosomas pelo exame a fresco.

Torres (1915) tambem não observou flagelados no sangue nem fórmas de multiplicação do *S. cruzi* nos tecidos deste Vertebrado.

Entre os inimigos naturais do *T. megista*, além do *Telenomus fariai* microlepidoptero que parasita os óvos dos triatomas (Costa Lima), póde-se contar uma pequena aranha, que é frequente nas habitações infestadas por barbeiros, Encontrámos exemplares desta aranha devorando larvas e ninfas de barbeiros.

— Fáto que sempre chama a atenção de quem percorre as regiões mineiras assoladas pela tripanosomiase é a quantidade extraordinária de triatomas que infesta as habitações humanas, os quais em muito alta percentagem estão infectados pelo *S. cruzi* (Chagas, Torres, etc.). Os proprios leitos dos moradores e suas vizinhanças servem de abrigo aos hemipteros, apresentando-se as cobertas e travesseiros quasi sempre salpicadas

por quantidade impressionante de dejeções dos barbeiros. Esta circunstancia é de grande importancia para a compreensão do mecanismo da transmissão por contaminação da doença de Chagas. Observámos tambem nas cobertas e nas roupas dos individuos manchas de sangue produzidas pelo esmagamento do inséto depois de cheio, assim como fomos informados da frequencia desta ocorrencia.

Fáto importante para a transmissão e que complica a profilaxía da molestia de Chagas é o da eliminação pelo mesmo inséto de varias dejeções, que pódem ser sempre muito ricas de fórmas infectantes; existe assim a possibilidade da infecção de diversos individuos pelo mesmo hemiptero, depois de uma refeição, por contaminação pelas excreções através a péle ou as mucosas.

—Como vimos, segundo Torres, a principal fonte de infecção dos Hemipteros na natureza é constituida pelos Vertebrados. Tanto os animais com infecção sanguinea aparente, como aqueles que já não apresentam parasitos no sangue pódem ser considerados como capazes de infectar o Invertebrado que sobre eles se alimenta; pelo menos teóricamente, póde-se admitir a possibilidade da infecção dos barbeiros pelas fórmas de multiplicação do *S. cruzi* existentes no tecido sub-cutaneo, analogamente ao que acontece nas leishmanióses [12].

Schizotrypanum de morcêgos

—A existencia de tripanosomas parasitos do sangue de morcêgos do Brasil foi assinalada ha muito tempo.

Recentemente A. Carini (1931) encontrou em esfregaços de sangue de morcêgos (*Phyllostomus hastatus*) enviados de Minas Gerais e de Goiaz um tripanosoma que, baseado em dados morfológicos, julgou provavelmente identico ao *Trypanosoma vespertilionis* (Battaglia) ou ao *Trypanosoma phyllostomae* (Cartaya), encontrado este no sangue de *Phyllostoma perspicillatum*.

Quando estivemos em Lassance em Abril de 1933 encontrámos no sangue de morcêgos que hoje sabemos ser da mesma especie que os de Carini (*Phyllostomus hastatus* Pallas), um flagelado de que demos noticia em recente publicação, (1933), demonstrando tratar-se de um *Schizotrypanum*. Recordaremos o que dissemos nesta publicação e acrecentaremos a seguir os novos dados que conseguimos sobre o assunto depois de outra viagem a Lassance.

Os primeiros morcêgos que examinámos foram apanhados no fôrro da casa que habitávamos, em numero de 22, tendo sido achados 5 com

---

[12] Vêr Wenyon, 1932.

infecção pelo flagelado (22,7 %). Estes Cheiropteros foram classificados no Museu Paulista[13] como *Phyllostomus hastatus* Pallas.

Em um unico exemplar os parasitos eram numerosos no sangue, sendo nos outros muito ligeira a infecção sanguinea.

O tripanosoma sanguicola é morfológicamente muito semelhante ao *S. cruzi*, como já o assinaláram alguns autores no caso de hemoflagelados de Cheirópteros de outros paizes. Méde cerca de 20 micra de comprimento, possúe blefaroplasto grande junto á extremidade posterior, nucleo oval, mediano ou mais próximo ao extremo anterior. Não vimos parasitos em divisão no sangue periférico. Ao exame a fresco algumas fórmas têm movimentos mais rapidos que outras; não observámos as grandes fórmas assinaladas por Sergent (1905) e Nicolle e Comte (1908) no sangue de morcêgos de outras regiões infectados pelo *T. vespertilionis*.

Fizemos o exame histológico de orgãos (coração, baço, figado, pulmão, rim, intestino, cerebro, musculo estriado) de 3 *P. hastatus* infectados; em 2 deles, que tinham raros tripanosomas no sangue, não encontrámos fórmas de multiplicação nos tecidos. Num exemplar muito infectado (n.º 3) encontrámos no pulmão e no intestino delgado duas celulas com numerosos parasitos sob á fórma de leishmanias mais ou menos alongadas (Estampa 12).

As celulas são relativamente grandes, de nucleo esférico central, unico, e membrana celular nítida, pouco espessa. No pulmão (fig. 20) a celula está localisada no proprio parenquima do orgão e no intestino (fig. 21) em plena camada muscular, não havendo sináis de reação inflamatória.

Estas celulas médem $43 \times 27\ \mu$ (pulmão) e $72 \times 50\ \mu$ (intestino) e segundo Torres, que examinou nossos preparados, são semelhantes aos gigantocitos quisticos por ele e Penna de Azevedo (1929) descrito nos tatús infectados pelo *S. cruzi*. Comparem-se as figuras 20, 21, e 6 deste trabalho.

Inoculações: Com sangue de morcego pouco infectado fizemos inoculações em 2 cobaias: uma morreu no dia seguinte e outra 15 dias depois, sem tripansomas no sangue.

2 cobaias foram inoculadas em 10-IV-33 com sangue de morcêgo bastante infectado (n.º 3):

Cobaia 1—examinada quasi diariamente até o dia da mórte, em 23-VI-33, sem ter tido infecção sanguinea aparente e com exame histológico de coração, baço e rim negativo. A reação de Machado foi negativa em 9 e 26-V-33, e em 2-VI-33.

[13] Por intermédio do Dr. Lauro Travassos, a quem agradecemos.

Cobaia 2—Os exames a fresco do sangue, repetidamente feitos durante 30 dias, foram tambem negativos; inoculada em 9-V-33 com *S. cruzi* (amostra recentemente isolada de cão), adquiriu a infecção em prazo normal. Neste mesmo dia, antes de ser inoculada, fizemos passagem de 3 a 4 c.c. de seu sangue para cobaia nóva, que morreu em 30-V-33 sem ter tido tripanosomas no sangue periférico e sem fórmas parasitárias do coração. A cobaia 2 teve reação de Machado (feita, como na precedente, pelo Dr. Villela) negativa em 9-V-33, antes de ser inoculada com *S. cruzi*, e positiva em 26-V e 2-VI-33, depois de inoculada com este parasito; morreu em 30-VI--33, infectada, com leishmanias no coração.

Voltando nóvamente a Lassance, em Julho deste ano, examinámos o sangue de numerosos morcegos, dos quais apenas 3 ou 4 eram *P. hastatus*. Só encontrámos um pequeno morcego infectado: *Miotis nigricans* (Wied). Os outros, examinados desta vez, pertenciam ás seguintes especies, segundo classificação que devemos ao Museu Paulista:

Lonchoglossa ecaudata Wied.
Diphylla ecaudata Spix.
Histiotus velatus Geoffr.
Nyctinomus macrotis Gray.
Desmodus rufus Wied.
Phyllostoma hastatus Pallas.
Mofossus sp.

Examinámos 15 morcêgos em Belo Horizonte[14] tambem com resultado negativo; um unico exemplar foi encontrado nesta cidade e que não tinha sido achado em Lassance: *Nyctinomus macrotis*.

O exemplar de *Miotis nigricans* achado infectado em Lassance (nº 4) tinha infecção sanguinea bastante intensa. Seu sangue foi inoculado em 1 rato branco e 1 camondongo branco, adultos, em 6-VII-33. O rato foi examinado até Novembro, sempre negativo.

O camondongo teve exames tambem negativos até 9-VIII-33, quando foi inoculado com *S. cruzi* (sangue de cão, raça de cão, 4a passagem), morrendo infectado em 13-VIII-33. Antes da inoculação do *S. cruzi* fizemos passagem do sangue deste camondongo para outro, que até agóra (XI-933) não teve tripanosomas no sangue.

As tentativas de transmissão de tripanosomas de morcegos a animais de laboratorio tem sido negativas á exceção das de Battaglia (1914) que conseguiu infectar cobaias e coelhos, não havendo experiencias confirmativas das deste autor. Os irmãos Sergent (1905) inocularam sangue de mor-

[14] Graças ao obséquio do Dr. Octavio Magalhães.

cegos infectados (*Vespertilio kuhli*, *Myotis murinus* Schreber) em camondongos brancos, ratos brancos e coelhos, não conseguindo a infecção.

Nos tecidos do *Miotis nigricans* infectado não encontrámos fórmas de multiplicação do flagelado (coração, pulmão, intestino, baço).

Clark e Dunn (1932) inocularam sangue de animais infectados pelo *S. cruzi* em morcegos, encontrando raros parasitos no sangue dos Cheiropteros inoculados.

Em 11 morcegos capturados em Belo Horizonte, com exames de sangue negativos, inoculámos sangue de cão infectado pelo *S. cruzi* (raça de tatú), em 20-VII-33. 6 dias depois só restavam 2 vivos, que foram sacrificados: 1 *Histiotus velatus*, sem parasitos na circulação nem no ponto de inoculação, e 1 *Nyctinomus macrotis*, em cujo sangue encontravam-se tripanosomas com facilidade e tinha fórmas de leishmania no tecido subcutaneo do ponto de inoculação.

Ao partirmos de Lassance, em 13-VII-33, semeamos em 2 tubos de Noguchi e 1 de agar-sangue, gotas de sangue de um *P. hastatus* que tinha sido examinado a fresco com resultado negativo.

Examinados alguns dias mais tarde, estes tubos estavam estéreis.

Em 26-X-33 um tubo Noguchi continha numerosas fórmas de evolução (critidias e tripanosomas) de um flagelado; os outros tubos estavam contaminados.

Infelizmente não poderemos dar no presente trabalho os caractéres culturais deste *Schizotrypanum*, o que faremos posteriormente, comparando-os o quanto possivel com os dados de Chatton e Courrier (1921) sobre o *Schizotrypanum pipistrelli* isolado do *Vesperugo pipistrellus*, e os de Nicolle e Comte (1908) sobre o *T. vespertilionis*, obtido do *Vespertilio kuhli*; segundo Chatton e Courrier ha diferenças na evolução cultural destes hemoflagelados de Cheiropteros. O que podemos dizer por emquanto é que entre as culturas de *S. cruzi* e as do *Schizotrypanum* por nós isolado do sangue do *P. hastatus* em Lassance, ha certas diferenças.

Cultura deste *Schizotrypanum* em meio de Noguchi, com 106 dias, foi misturada com sangue desfibrinado de camondongo e pósta num pequeno tubo, e ingerida através péle fresca de camondongo por larvas de *T. megista* virgens, em 4-XI-33. 4 destas larvas, que se encheram bastante, foram sacrificadas e examinadas 10 dias depois, não tendo sido encontrados flagelados no conteúdo intestinal.

Esta experiencia parece indicar que o *Schizotrypanum* do morcego não evolúe no transmissôr do *S. cruzi*. Este resultado, confirmado, será de grande valôr para a distinção definitiva entre estes flagelados.—As culturas que possuimos tambem não são infectantes para camondongos brancos: 4 destes animais inoculados em 9-XI-33 ainda não tiveram parasitos no san-

gue (até 25-I-34). Inoculações de culturas de *T. vespertilionis* foram tambem feitas por E. Pringault (1914) em camondongos, cobaias e coelho jóven, com resultados negativos.

—Os tripanosomas de Cheiropteros são ainda muito mal estudados, o que não nos permite a identificação do *Schizotrypanum* dos morcegos de Lassance com as especies já descritas.

Nossas experiencias tornam muito provavel a hipótese de tratar-se de um parasito não patogenico, possivelmente do *T. vespertilionis* Battaglia 1904, o primeiro tripanosoma descrito em Cheirópteros.

Chatton e Courrier (1921) denominaram *Schizotrypanum pipistrelli* um hemoflagelado de morcego, de que descreveram fórmas de multiplica- « intratissulares » : grandes quistos cercados por delgada membrana, contendo numerosos parasitos critidiomórficos e algumas vezes restos nucleares (que fazem supôr uma localisação inicialmente intracelular). Estes quistos desenvolvem-se no tecido conjuntivo de varios órgãos como estomago e intestino (mucósa e submucósa) vesicula biliár, rim, bexiga, baço, ovário, útero, epididimo, attingindo ás vezes 200 de diametro. Os referidos autores não encontraram quistos no pulmão nem na tunica muscular do intestino.

Considera-se hoje o *S. pipistrelli* identico ao *T. vespertilionis*, que ficará assim conhecido como *S. vespertilionis*.

G. Franchini (1921) encontrou no figado e principalmente no pulmão de *Vesperugo pipistrellus* infectados parasitos leishmaniformes e fórmas jóvens (tripanosomas), nunca tendo visto fórmas de critidia. Os exames de *frottis* de baço, testiculo, bem como nos de conteúdo e parêde de estomago e intestino, não revelaram a prensença de parasitos. As celulas parasitadas que encontrámos no pulmão e no intestino de *P. hastatus* são bem diferentes dos quistos descritos por Chatton e Courrier, como se póde ver comparando-se as nossas figuras com as destes autores.

Recentemente, Clark e Dunn (1932) observaram a infecção de várias especies de morcegos do Panamá por um tripanosoma, conseguindo transmitir a infecção a rato branco por inoculação de sangue de 3 *Artibeus jamaicensis jamaicensis* (exame a fresco do sangue negativo). O parasito foi depois inoculado a outros animais, concluindo aqueles pesquizadores ser o mesmo o *S. cruzi*, que naquéla região é bastante espalhado.

Clark e Dunn não referem a existencia de fórmas parasitárias nos tecidos dos morcegos nem dos animais infectados com sangue destes.

Para concluir, acreditamo-nos com elementos suficientes para assegurar que o hemoflagelado que isolámos de morcêgos de Lassance não é o *S. cruzi*. Poderá ser o *Schizotrypanum vespertilionis* ou um novo *Schizo-*

trypanum, distinguivel do *S. cruzi* principalmente pela sua não-infectividade para os animais de laboratorio.

Sendo os Cheiropteros sensiveis á infecção pelo *S. cruzi*, poder-se-á dar o caso destes mamiferos se apresentarem naturalmente infectados por este parasito nas zonas onde êle existe, como parecem ter verificado Clark e Dunn no Panamá. Nestas zonas dever-se-á sempre proceder á inoculação em Vertebrados sensiveis ao *S. cruzi*, para se distinguir deste parasito o flagelado próprio dos morcegos.

Terminaremos como no nosso trabalho anterior: a possivel coexistencia dos dois parasitos tão próximos, *Schizotrypanum cruzi* Chagas, 1909 e *Schizotrypanum vespertilionis* (Battaglia 1904), como parece acontecer em Lassance e provavelmente em outras regiões, mostra a importancia e a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a biologia dos tripanosomas dos morcêgos.

BIBLIOGRAFIA

ADLER, S. 1933—Mode de transmission des Protozoaires sanguicoles et particulièrement des Leishmanioses. Bull. Soc. Pat. Ex. XXVI, 207.

BARRETO, A. B. 1919—Nótas entomológicas. Estudos sobre a anatomía do genero Triatoma. Probócida e tubo digestívo. Brasil Médico, 21, 161.

BARRETO, A. B. 1923—Nótas entomológicas. Estudos sobre a anatomía do genero Triatoma. Aparêlho salivar. Mem. Inst. Osw. Cruz, XV, 127.

BATTAGLIA, M. 1904—Alcune ricerche sopra due Trypanosomi (Tryp. vespertilionis, Tryp. lewisi): Ann. Med. Nav., 10, 517.

BATTAGLIA, M. 1914—Biologische Differentialcharaktere fuer einige Trypanosomen. Centr., f. Bakt., Orig., 72, 582.

BLACKLOCK, B. 1914—On the multiplication and infectivity of T. cruzi in Cimex lectularius. Brit. Med. Jour., 1, 912.

BLANCHARD, M. 1912—Sur un travail de M. le Dr. E. Brumpt intitulé: Étude expérimentale de la Trypanosomiase américaine de C. Chagas. Bull. Acad. Méd. Paris, 67, 24.

BLANCHARD, M. 1912—Marche de l'infection à Schziotrypanum cruzi chez la cobaye et la souris blanche. Bull. Soc. Path. Ex., 5, 598.

BORGHI, B. 1932—Bestehen bei Trypanosoma lewisi Unterschiede zwischen den Formen aus dem Blute und solchen aus

dem Uebertrager? Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr., 113, 490.

BRUMPT, E. e Da Silva, P. 1912—Éxistence du Schizotrypanum cruzi à Bahia (Matta de São João). Biologie du Conorrhinus megistus. Bull. Soc. Path. Ex., 5, 22.

BRUMPT, E. 1912—Schiz. cruzi à différentes phases de son cycle évolutif. Bull. Soc. Path. Ex., 5, 261.

BRUMPT, E. 1912—Le Trypanosoma cruzi évolue chez Conorrhinus megistus, Cimex lectularius, Cimex boueti et Ornithodorus moubata. Cycle évolutif de ce parasite. Boll. Soc. Path. Ex., 5, 360.

BRUMPT, E. 1912—Pénétration du Schizotrypanum cruzi à travers la muqueuse oculaire saine. Bull. Soc. Path. Ex., 5, 723.

BRUMPT, E. 1913—Évolution de Trypanosoma lewisi, duttoni, nabiasi, blanchardi, chez les puces et les punaises. Transmission per les déjéctions. Comparaison avec T. cruzi. Bull. Soc. Path. Ex., 6, 167.

BRUMPT, E. 1913—Immunité partielle dans les infections à T. cruzi. Transmission de ce trypanosome par Cimex rotundatus. Rôle régulateur des hôtes intermédiaires. Passage á travers la peau. Bull. Soc. Path. Ex., 6, 172.

BRUMPT, E. 1914—Importance du cannibalisme et de la coprophagie chez les Réduvidés hématophages (Rhodnius, Triatoma) pour la conservation des trypanosomas pathogènes en dehors de l'hôte Vertébré. Bull. Soc. Path. Ex., 7,702.

BRUMPT, E. 1914—Le xénodiagnostique. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la Trypanosomose de Chagas. Bull. Soc. Path. Ex., 7, 706.

Brumpt, E. 1919—Maladie de C. Chagas, au Brésil. Mode de transmission, origine, conditions qui déterminent sa repartition actuelle. Bull. Acad. Méd. Paris, 81, 251.

BRUMPT, E. 1922—Précis de Parasitologie, 3.e éd., Paris, Masson.

BRUMPT, E. 1927—Précis de Parasitologie, 4.e éd., Paris, Masson.

Brumpt, E. 1927—Éclécticisme alimentaire des Réduvidés vecteurs du Trypanosoma cruzi. Prèsse Méd., 35, 1161.

BRUMPT, E., e Gomes, J. F. 1914.—Description d'une nouvelle espèce de

Triatoma (T. chagasi), hôte primitif du Trypanosoma cruzi Chagas. Ann. Paul. Med. e Cir., 3,73.

BRUNI, N. 1926—Observations et recherches sur Trypanosoma lewisi et Schizotrypanum cruzi. Bull. Soc. Path. Ex., 19, 791.

BUCHNER, P. 1921—Tier und Pflanzen in intracellularer Symbiose. Berlin.

BUCHNER, P. 1922—Hematophagie und Symbiose. — Die Naturwiss., 10, 703.

CARINI, A. 1931—Sobre um trypanosoma do sangue de um morcêgo do Brasil. Séptima Reunión Soc. Arg. Patol., Reg. del Norte, Tucmán, Octubre 1931.

CARPANO, M. 1932—Localisations du Trypanosoma theileri dans les organes intèrnes des Bovins. Son cycle évolutif. Ann. Parasit., X, 305.

CHAGAS, C. 1909—Nóva tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfológia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi. n. gen., n. sp., agente etiológico de nóva entidade mórbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, I, fasc. 2.

CHAGAS,C.1911——Le cycle évolutif de Schizotrypanum cruzi chez l'homme et les animaux de laboratoire. Bull. Soc. Pat. Ex., 4, 467.

CHAGAS, C. 1912—Sôbre um tripanosoma do Tatú, Tatusia novemcincta. Possibilidade de ser o tatú um depositário do Trypanosoma cruzi no mundo exterior (nóta prévia). Brasil Méd., ano 26, n.º 30, p. 305.

CHAGAS, C. 1927—Quelques aspects évolutifs du Trypanosoma cruzi dans l'insect transmetteur. C. R. Soc. Biol., 97, 829.

CHAGAS, C., VILLELA, E., e ROCHA LIMA, H. da, 1929—Amerikanische Trypanosomenkrankheit, Chagas-Krankheit. In C. Mense, Handb. der Tropen krankh., 3. Auf., 5, 673.

CHATTON, E. e COURRIER, R. 1921 — Sur un Trypanosome de la Chauvesouris, Vesperugo pipistrellus, à des formes crithidiennes intratissulaires et cystigènes. Hypothèse relative à l'étiologie du goître endemique. C. R. Acad. Sciences, 172, 1254.

CHATTON, E. e COURRIER, R. 1921 — Un Schizotrypannum chez les Chauvesouris (Vesperugo pipistrellus) en Basse Alsace. Schizotrypanose et goître endemique. C. R. Soc. Biol., 84, 943.

CLARK, H. C., e DUNN, H. L.—Experimental Studies on Chagas'Disease in Panamá. Am. Jour. Trop. Med., XII, 49.

COLLIER, W. A. 1931—Ueber Immunitaet bei der Chagas-Krankheit der weissen Maus. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr., 112, 88.

CUNHA, A. M.1923—Doença de Chagas (O Schizotrypanum e sua transmissão). Folha méd. ano IV, p. 17.

DELANOE, M., et Mme. 1912—A' propos du Schizotrypanum cruzi. Bull. Soc. Path. Ex., 5, 599.

DIAS, EMMANUEL. 1930—Da presença de fórmas de evolução do Trypanosoma cruzi Chagas, nos tubos de Malpighi do barbeiro. Mem. Inst. Osw. Cruz, XXIV, 183.

DIAS, E. 1932—O Trypanosoma cruzi póde evoluir na cavidade geral do Triatoma megista. Mem. Inst. Osw. Cruz, XXVI. 83.

DIAS, E. 1932—Le Trypanosoma cruzi pendant les premières phases de l'infection expèrimentale: C. R. Soc. Biol., CX, 203.

DIAS, E. 1932—Le Trypanosoma cruzi et ses rapports avec le Système réticulo-endothélial. C. R. Soc. Biol., CX, 206.

DIAS, E. 1932—Sur les déjéctions du Triatoma megista. Aspects du Trypanosoma cruzi que l'on y rencontre. C. R. Soc. Biol., CXI, 486.

DIAS, E. 1932—Expérience sur la transmission du Trypanosoma cruzi de l'Insect au Vertébré. C. R. Soc. Biol., CXI, 490.

DIAS, E. 1933—Immunité naturelle des animaux à sang froid vis-à-vis de l'infection par le Trypanosoma cruzi. C. R. Soc. Biol., CXII, 1474.

DIAS, E. 1933—Sobre um Schizotrypanum de um morcêgo do Brasil. (Nóta preliminar). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, XXVII, 139.

DIAS, E. 1933—Estudos sobre o Schizotrypanum cruzi. Tése de doutoramento, apresentada á Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro.

DIOS, WERNGREN e PÉREZ, 1929—Sensibilidad del sapo al T. cruzi. Rev. Soc. Arg. Biol., n.º 8-9, 621.

FARIA, J. G. e CRUZ FILHO, O. 1927—Sobre a ocorrencia de um estágio intracelular de desenvolvimento do Trypanosoma cruzi no Triatoma megista Burm. Bol. Inst. Bras. Sc., 3, 375.

FARIA, J. G. e CRUZ FILHO, O. 1927—Sur l'existence d'un stade évolutif incracellulaire du Trypanosoma cruzi dans le Triatoma megista Burm. C. R. Soc. Biol., 97, 1355.

FRANCHINI, G. 1921—Trypanosome de la Chauve-souris en Italie. Formes viscérales et stades de développement chez un acarien gamaside, le Leiognathus laverani, n. sp. Bull. Soc. Path. Ex., XIV, 542.

FREUND, R. 1932—Das Problem des reticulo-endothelialen Systems. (Ein Beitrag zur Partialfunktion der Zelle). Virchows Arch., 286, 526.

GALLIARD, H. 1929—Remarques sur la culture de Trypanosoma cruzi Chagas. Ann. Parasit., VII, 367.

GALLIARD, H. 1929—Envahissement précoce et intense de la cavité abdominale chez la souris au cours des infections à Trypanosoma cruzi. Ann. Parasit., VII, 377.

GALLIARD, H. 1930—Infections à Trypanosoma cruzi chez les animaux splenectomisés. Bull. Soc. Path. Ex., XXIII, 188.

GUERREIRO, C., e MACHADO, A. 1913—A reacção de Bordet e Gengou na molestia de Chagas como elemento de diagnóstico. Brasil Méd., 23, 225.

GUGLIELMO, G. 1933—Sistema reticulo-endotheliale. In A. FERRATA, Le Emopatíe, 1, 438. Milano.

HARTMANN, M. 1910—Notiz ueber eine weitere Art der Schizogonie bei Schizotrypanum cruzi Chagas. Arch. f. Protistenk., 20, 361.

HOARE, C. A. e COUTELEN, F. 1933 — Essai de classification des Trypanosomes des Mammifères et de l'homme basée sur leurs caractères morphologiques et biologiques. Ann. de Paras., XI, n.º 3, p. 198.

ITURBE, J. e GANZÁLEZ, E. 1916—Un nuevo trypanosoma de Vampirops lineatus. Revísta Vargas, Carácas.

KOFOID, C. A. e DONAT, F. 1933—Experimental infection with Trypanosoma cruzi from intestine of Cone-nose Bug, Triatoma protracta. Proc. Soc. Exp. Biol a Med., 30, 489.

KOFOID, C. A. e DONAT, F. 1933—The experimental transfer of Trypanosoma cruzi from naturally infected Triatoma protracta to Mammals in California. Bull. Soc. Path. 26, 257.

KRITSCHEWSKI, I. e SCHWARZMANN, 1928—Die Bedeutung des reticulo-endothelialen Apparates bei Infektionskrankheiten. Zeitschr. f. Immunitaetsforsch., 56, 322.

KUROTCHKIN, J. T. e CHUNG, H. L. 1930—Kala-Azar infection as a

Biological method of blocking the Reticulo-endothelial-systems. The Nat. Med. Jour. of China, XVI, 43:

KUSKOP, M. 1923—Bakteriensymbiosen bei Wanzen (Hemiptera Heteroptera). Arch. f. Protistenk., 47, 350:

LACORTE, J. G. 1926 — A reacção do desvío de complemento na moléstia de Chagas. Tése de doutoramento, Rio de Janeiro.

LACORTE, J. G. 1927—A reacção do desvío de complemento na moléstia de Chagas. Mem. Inst. Osw. Cruz, XX, 197.

LAFONT, A. 1912—Trypanosomide d'un Réduvide (Conorrhinus rubrofasciatus) inoculable à la souris. Ann. Inst. Pasteur, 26, 893.

LAVERAN e MESNIL 1912—Trypanosomes et Trypanosomiases, 2e édition.

LAVERAN, 1917—Leishmanioses. Masson et Cie., Paris.

LIMA, A. da Costa, 1927—Notas sobre o Telenomus fariai, novo Scelionideo, parasíto endóphago dos óvos de Triatoma megista Burm. Sciencia Méd. 5, 450.

MARCHAL, P. 1890—L'acide urique et la fonction renale chez les Invertébrés. Mem. Soc. Zool. France, 111, 31.

MAYER, M. 1922—Ueber die Vererbung von Schizotrypanum cruzi im Zwischenwirt. Münch. Med. Woch., 40, 1444.

MAYER, M. e ROCHA LIMA, H. da 1912—Zur Entwicklung von Schizotrypanum cruzi in Säugetieren. Arch. f. Schiffs—u. Tropenhyg., 16, 376.

MAYER, M. e ROCHA LIMA, H. da 1914—Zum Verhalten von Schizotrypanum cruzi in Warmblütern und Arthropoden. Arch. f. Schiffs.—u. Tropenhyg., 18, Beih., 257.

MAZZA, S. 1926—Observación de infección espontánea del perro por el Schizotrypanum cruzi. Primera Reunión Soc. Arg. Pat. Reg. del Norte, Jujuy.

MINCHIN, E. A. 1914 — The developement of Trypanosomes in Invertebrate Host. Nature, 94, 406.

MINCHIN, E. A. e THOMSON, J. D. 1915—The Rat-trypanosome, Trypanosoma lewisi, in its relation to the Rat-flea, Ceratophyllus fasciatus. Quart. Jour. Microsc. Science, 60, 463.

NATTAN LARRIER 1921—Infections à trypanosomes et voies de pénétrades virus. Bull. Soc. Path. Ex., 14, 537.

NEIVA, A. 1910—Informações sobre a biologia do Conorrhinus megistus Burm.-Mem. Inst. Osw. Cruz, 2, 206.

NEIVA, A. 1913—Transmissão do Trypanosoma cruzi pelo Rhipicephalus sanguineus. Brasil Méd., 46, 498.

NEIVA, A. 1914—Contribuição para o estudo dos Reduvideos hematofagos. Mem. Inst. Osw. Cruz, 6, 35.

NICOLLE, C. e Comte, 1908—Sur un trypanosome d'une Chauve-souris, Arch. Inst. Past. Tunis, 3, 69.

NICOLLE, C. e COMTE 1909 — Contribution à l'étude du Trypanosoma vespertilionis, Arch. Inst. Past. Tunis, 4, 202.

NIESCHULZ, O. e RONTOE, F. K. W. 1930—Ueber den Einfluss der Milzextirpation bei Infektionen mit Trypanosoma gambiense und Schizotrypanum cruzi. Zeitschr. f. Immunitätsforschung, 65, 312.

NINO, F. L. 1925—Ensáios de infección experimental del Bufo marinus (sapo) con Schizotrypanum cruzi. Prensa Méd. Arg. XI, 1154.

NOEL, R. e TAHIR, E. 1929—Des prolongements dits ciliformes des cellules de l'epithélium des tubes de Malpighi chez Bombix mori. Arch. Anat. Micr., XXV, 586.

NOELLER, W. 1917—Blut-und Insektenflagellatenzuchtung auf Platten. Arch. F. Schiffs- und Trop.-Hyg. 21, 53.

NOELLER, W. 1920—Neuere Forschungen auf den Gebiete der Trypanosomenzüchtungen. Arch. f. Schiffs-u. Trop. Hyg., 24, 168.

NOELLER, W. 1931—Die Züchtung der parasitischen Protozoen. In Handb. der Path. Protozoen, V. Prowazek, Bd. 3, 1815.

PACKARD, A. 1909—Text-book of Entomology, p. 186.

PATTON, W. S. e EVANS, A. M. 1929. — Insects, Ticks, Mites and venomous animals of medical and veterinary importance. 1, 589.

PINTO, C. 1930—Tratado de Parasitologia. IV—Arthropodes parasitos e transmissores de doenças. Bibliotéca Cientifica Brasileira.

PITTALUGA, G. 1927—Die «Blockierung» des reticulo-endothelialen-Systems bei vizeraler Leishmaniose (Kala-azar) Arch. f. Schiffs-u. Tropen. Hyg., 31, 340.

PRINGAULT, E. 1914—Non pathogenicité du Trypanosoma vespertilionis (Battaglia) pour les animaux de laboratoire. C. R. Soc. Biol., 76, 883.

REGENDANZ, P. 1930—Der Verlauf der Infektion mit Schizotrypanum cruzi (Chagas) bei jungen Ratten und über die

Unempfänglichkeit erwachsener Ratten für Schizotrypanum. Centralbl. f. Bakt., Orig., 116, 256.

RIBBERT, H. 1904—Die Abscheidung intravenös injizierten gelösten Karmins in den Geweben. Zeitschr. Allg. Physiol., 4, 201.

ROBERTSON, A. 1929 — Note on a trypanosome morphologically similar to Trypanosoma cruzi Chagas, 1909, found in an opossum, Didelphis marsupialis, captured at Tela, Honduras, Central America. Eighteenth Annual Report of the Medical Department of the United Fruit Company, p. 293.

ROUBAUD, E. 1919—Les particularités de la nutrition et la vie symbiotique chez les mouches Tsétsés. Ann. Ins. Pasteur, 33.

SCHILLING, A. 1904—Uber die Tsetsekrankheit oder Nagana Arb. a. d. Kaiserl. Gesundh., 21, 476.

SERGENT, Ed. e Et. 1905—Sur des trypanosomes des Chauves-souris. C. R. Soc. Biol., 58, 53.

SOUZA ARAUJO (LUTZ, A., SOUZA ARAUJO, H. C. e FONSECA, O.) 1918 — Viagem scientifica no Rio Paraná e a Asuncion com volta por Buenos Aires, Montevidéo e Rio Grande. Mem. Instituto Oswaldo Cruz, T. 10, p. 104 (p. 150).

SOUZA CAMPOS, E. 1929—Studies upon a neurotropic strain of Trypanosoma cruzi. Jour. Techn. Meth. a. Bul. Internat. Ass. Med. Museum. XII, 146.

SOUZA CAMPOS, E. 1929—Alterações pathologicas do tecido adiposo na molestia de Chagas congenita experimental. Bol. Biólogico, 15-16, 75.

SOUZA CAMPOS, E. 1929—Córpos intranucleares nas celulas do reticulo endotélial do ganglio limfático parasitado pelo Schizotrypanum cruzi. Nóta prévia. Bol. Biológico, 15-16, 99.

SZENT-GYORGYI, A. 1921—Kataphoreseversuche an Kleinlebewesen. Bioch. Zeitschr., 113, 29.

TALICE, R. V. 1929—Parasitisme de Triatoma rubrovária par un Sporozoaire. Ann. Parasit., VII, 257.

TORRES, C. M. 1915—Alguns fatos que interessam á epidemioiogia da moléstia de Chagas. Mem. Inst. Osw. Cruz, VII, 120.

TORRES, C. M. 1918—Observação sobre a infecção sanguinea em animais

inoculados com o Trypanosoma cruzi. Anais do VIII Congresso Bras. de Med., Vol. 1, 1925, p. 411.

TORRES, C. M. 1922—Cultura do Schizotrypanum cruzi, Chagas, 1909, em meio liquido. Influencia da concentração dos ions H sobre a cultura. Verificação precóce do Schizotrypanum no sangue. Brasil Méd., ano 36, 317.

TORRES C. M. 1930—Patogenia de la miocarditis crónica en la enfermedad de Chagas. Quinta Reunión Soc. Arg. Pat. Regional del Nórte, Jujuy, 2, 902.

TORRES, C. M. e PENNA DE AZEVEDO, A. 1930—Celulas con membrana quistica encerrando el Trypanosoma cruzi. Quinta Reunión Soc. Arg. Pat. Reg. del Nórte, Jujuy, Octubre 1929, 2, 868.

VIANNA, G. 1911—Contribuição para o estudo da anatomia patólogica da da Molestia de Carlos Chagas. Mem. Inst. Osw. Cruz, 3, 276.

VIANNA, G. 1914—Parasitismo da célula muscular lisa pela Leishmania brasiliensis. Mem. Inst. Osw. Cruz, 6, 40.

VILLELA EURICO 1924—Molestia de Chagas. Ann. 2º Congr. Bras. Hyg. Belo Horizonte, p. 103.

VILLELA, E. 1925—Variação do poder pathogenico do Trypanosoma cruzi (raça neurotrópica). Sciencia Méd., ano 3, p. 147.

VILLELA, E. 1930—Da occurrencia da doença de Chagas nos hospitais de Belo Horizonte e na população de seus arredores. Folha Méd., 20, 229.

VILLELA, E., e TORRES, C. M. 1926—Estudo histopathológico do systema nervoso central em paralysia experimental pelo Schizotrypanum cruzi. Mem. Inst. Osw. Cruz, 19, 175.

VILLELA, E. e VILLELA, EUDORO 1932—Elemento do Systema nervoso central parasitados pelo Trypanosoma cruzi. Mem. Inst. Osw. Cruz, 26, 77.

VOLTERRA, M. 1927—Ricerche sul Sistema reticolo istiocitário. Lo Spirimentale, ano 81, 319.

WENYON, C. M. 1926—Protozoology.

WENYON, C. M. 1932—The transmission of Leishmania infections. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hgy., XXV, 319.

WIGGLESWORTH, V. B. 1929—Digestion in the Tsetse-fly: a study of structure and function. Parasitology, 21, 288.

WOODCOCK, H. M. 1906—The Haemoflagellates. Quart. Jour. Microsc. Sc. 50, 151.

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS I—XII.

ESTAMPA I

Fig. 1—*S. cruzi* no sangue periférico de cobaia esplenectomisada, em divisão incompleta. 2 nucleos, 2 flagelos, blefaroplasto volumoso situado a igual distancia da extremidade posterior e do nucleo. Alcool absoluto, Giemsa.

Fig. 2—Ponto de inoculação de cão injectado com *S. cruzi,* raça humana, 5 dias depois da inoculação. Tecido subcutaneo com numerosos histiocitos parasitados. Zenker, H. E. (C. R. Soc. Biol., CX, 1932).

ESTAMPA II

Figs. 3-4—Ganglio linfatico superficial de cão, próximo ao ponto de inoculação. Numerósos elementos parasitados, celulas gigantes. *S.* cruzi, raça humana, 12º dia de infecção. Zenker, H. E. (Fig. 4—C. R. Soc. Biol., CX, 1932).

ESTAMPA III

Fig. 5—Celulas do tecido sub-cutaneo de cão inoculado sob a péle em varios pontos com *S. cruzi* e dias depois injetado nos mesmos logares com colóides. A, célula com parasitos e tinta da China. B, celula contendo leishmanias (1) e colargol (11). (C. R. S. B. idem).

Fig. 6—Gigantocito quistico do coração do tatú com infecção natural. Zenker, H. E. 1100 vezes.

ESTAMPA IV

Fig. 7—Tubo digestivo de *T. megista* adulto, femea. O intestino anterior corresponde á tromba e á porção esbranquiçada que se segue á cabeça. O intestino médio mostra nitidamente suas duas porções, a anterior, sacular, cheia de sangue em digestão, e a posterior, alongada, tubular, confinando com a empôla retal que é arredondada e de côr branca. A notar o grande desenvolvimento do intestino médio e a baixa inserção dos tubos de Malpighi. Material fresco, aumento pouco mais de 1 vez.

Fig. 8—Exemplares adultos de *T. megista* abertos pela face dorsal (5º tempo de dissecção), para mostrar a disposição natural dos orgãos internos na cavidade abdominal. A lamina quitinosa dorsal foi destacada, dobrada para trás e fixada por um alfinete á parafina. Material fresco. Aumento cerca de 2 vezes.

ESTAMPA V

Fig. 9—Intestino posterior de larva de *T. megista* sacrificada poucos minutos depois de se alimentar. Empôla retal fórtemente distendida pelas dejeções limpidas. Material fresco, entre lamina e laminula. No interior vê-se acumulada certa quantidade de cristais de uratos, junto ao ultimo anel abdominal. Fotografia tirada com a lamina mantida em posição vertical. 7 vezes.

Fig. 10—Córte de duodeno de *T. megista* com infecção antiga. Critidias numerosas. Zenker, Giemsa.

ESTAMPA VI

Fig. 11—Córte longitudinal quasi mediano de intestino posterior de *T. megista* adulto. Carnoy, Giemsa.

1)—porção terminal dos tubos de Malpighi.
2)—epitélio do intestino médio junto ao piloro.
3)—formação epitélial derivada das empôlas terminais.
4)—epitélio estriado retal.
5)—camada de parasitos aderentes ao epitélio retal.
6)—porção quitinosa do réto com numerosos parasitos.
7)—tubo de Malpighi.

Fig. 12—Córte da mesma região do mesmo inséto.

1)—empôlas terminais com alguns parasitos.
2)—epitélio rétal estriado.
3)—camada parasitaria.
4)—zona quitinósa com parasitos.
5)—tubos de Malpighi.
6)—intestino médio.

ESTAMPA VII

Fig. 13—Epitélio rétal do mesmo inséto, recoberto por densa camada de parasitos (haptomonas). Vêem-se tambem parasitos na empôla terminal e no inicio, da zona quitinosa do réto, onde o epitélio parece destacado. 310 vezes.

Fig. 14—Parede retal (A) e tubo de Malpighi (B) parasitados (haptomonas). A fig. *A* é semi-esquematica.

ESTAMPA VIII

Fig. 15—Córte longitudinal de tubo digestivo de *T. megista* adulto.

A—Intestino médio.
B—Região pilórica, embocadura dos tubos de Malpighi (atrium).
C—Empôla retal regularmente distendida por dejeções:

1—epitélio do mesênteron.
2—camada muscular.
3—divertículo junto ao orifício pilórico.
4—epitélio das empôlas terminais dos vasos excretôres.
5—epitélio rétal.
6—haptomonas.
7—parêde quitinósa do réto (lesada em certos pontos acidentalmente.
8—prolongamento do epitélio das empôlas terminais.
9—camada muscular retal.
10—tubo de Malpighi.

ESTAMPA IX

Fig. 16—Tubos de Malpighi de *T. megista* adulto, com numerosas critídias. (Mem. Inst. Osw. Cruz, XXIV, 1930).

ESTAMPA X

Fig. 17—Primeiras dejeções limpidas de *T. megista*, contendo traços de féses. Formas metacíclicas numerosíssimas. 225 vezes. Alc. absoluto, acido ósmico; Giemsa. (C. R. Soc. Biol., XC1, 1932).

Fig. 18—Tripanosomas metacíclicos das dejeções hialinas. 1.200 vezes. Mesma técnica. (idem).

ESTAMPA XI

Fig. 19—Fórmas evolutivas do *S. cruzi* no tubo digestivo do *T. megista*.

1- 2 estomago, 24 horas (adulto)
3- 8 „ 4 dias (larva)
7 tripanosoma fixo a um leucocíto
9-10 estomago, 21 dias (larva)
11-16 „ 36 dias (ninfa)

17-21 duodeno 48 horas (larva)
22-27 „ 5 dias (larva)
28-29 „ 5 dias (adulto)
30-34 „ 36 dias (ninfa)
35-48 réto—(infecções antigas, ninfas e adultos).

Fixação pelo acido ósmico e alcool absoluto. Giemsa.

ESTAMPA XII

Células parasitadas de *Phyllostomus hastatus*. Zenker, H. E.
Fig. 20—Célula do pulmão. 950 vezes.
Fig. 21—Célula do intestino delgado. 440 vezes. (Mem. I. O. C., XXVII, 1933).

(x)—Todas as figuras são originais. Algumas, conforme a indicação que as acompanha, já foram anteriormente publicadas.

Agradecemos aos Srs. J. Pinto e Antonio Pugas as fotografias e os desenhos com que documentamos este trabalho.

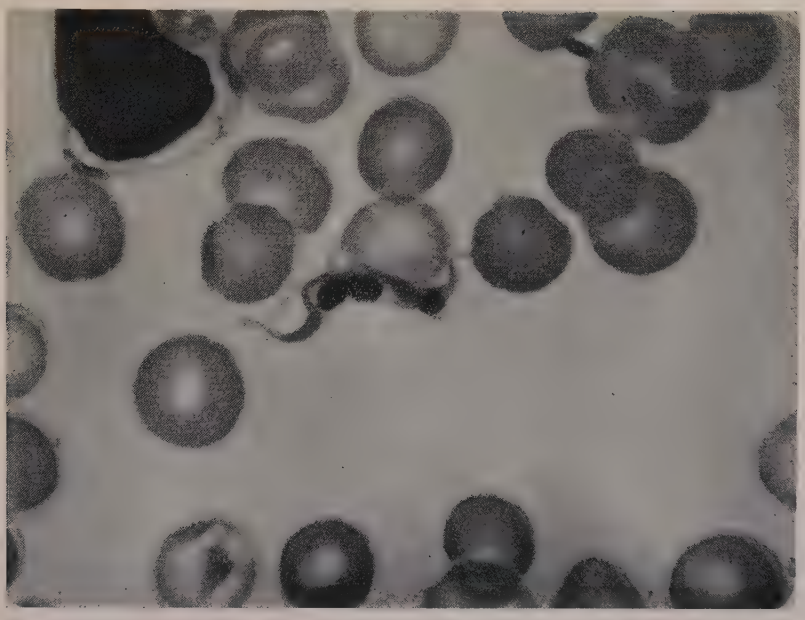


Fig. 1

Fotomicro de J. PINTO

Fig. 2

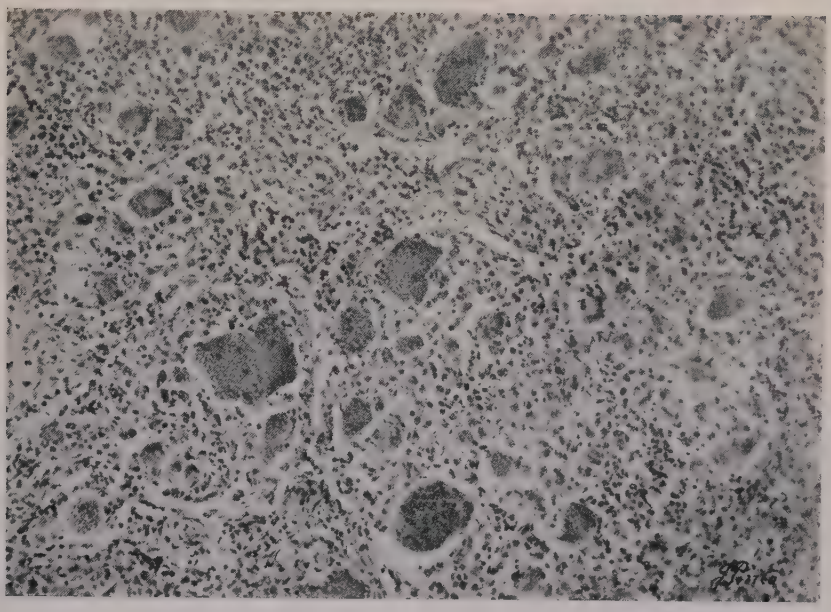
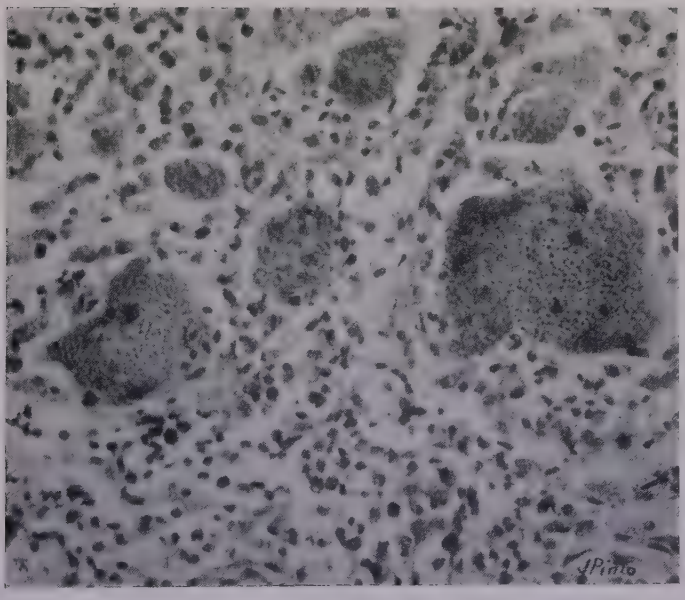


Fig. 3



Fotomicro de J. PINTO

Fig. 4

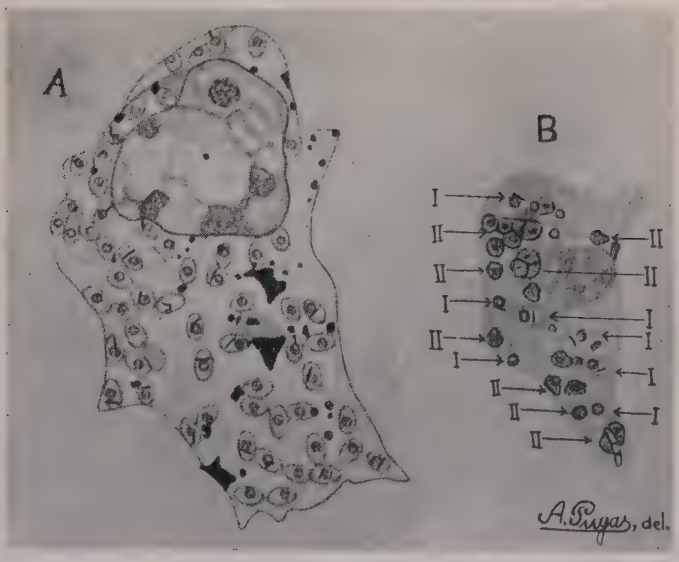
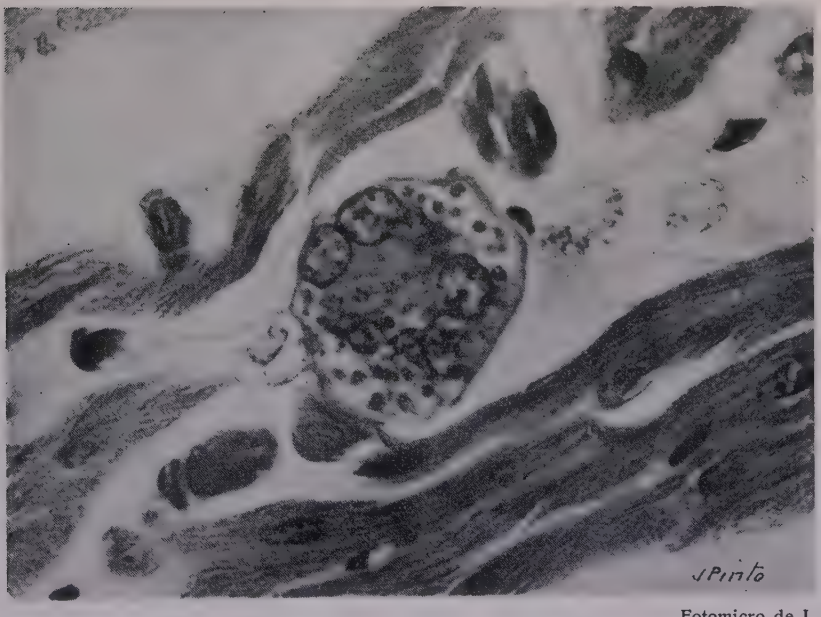


Fig. 5



Fotomicro de J. PINTO

Fig. 6

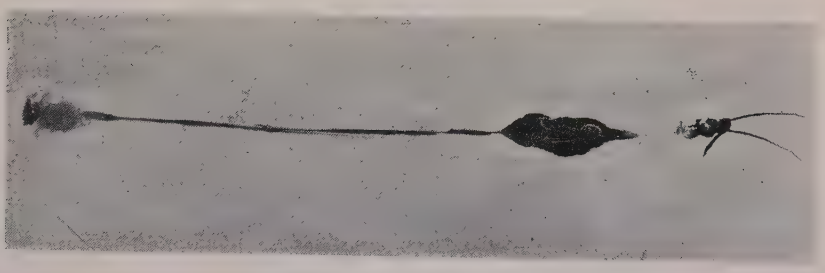


Fig. 7

Fig. 8

Fotomicro de J. PINTO

Fig. 9

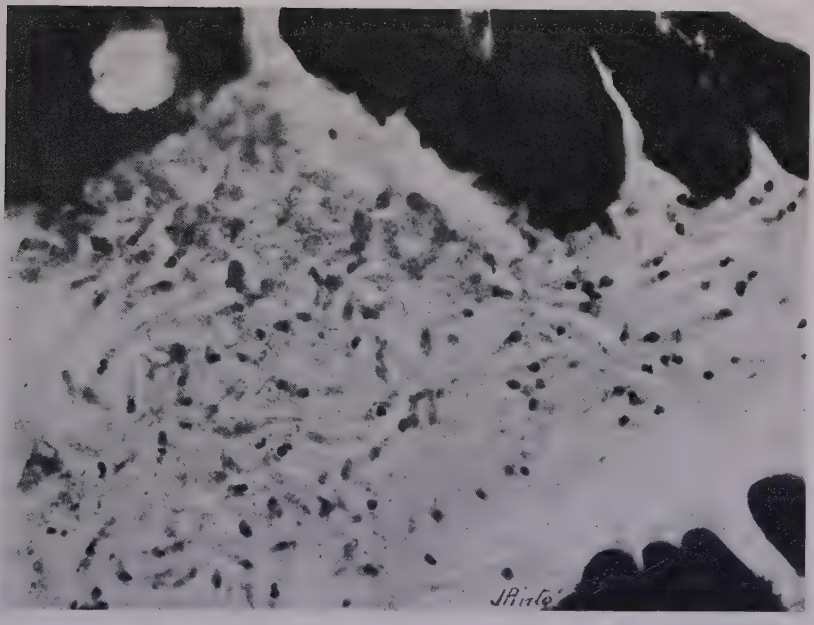
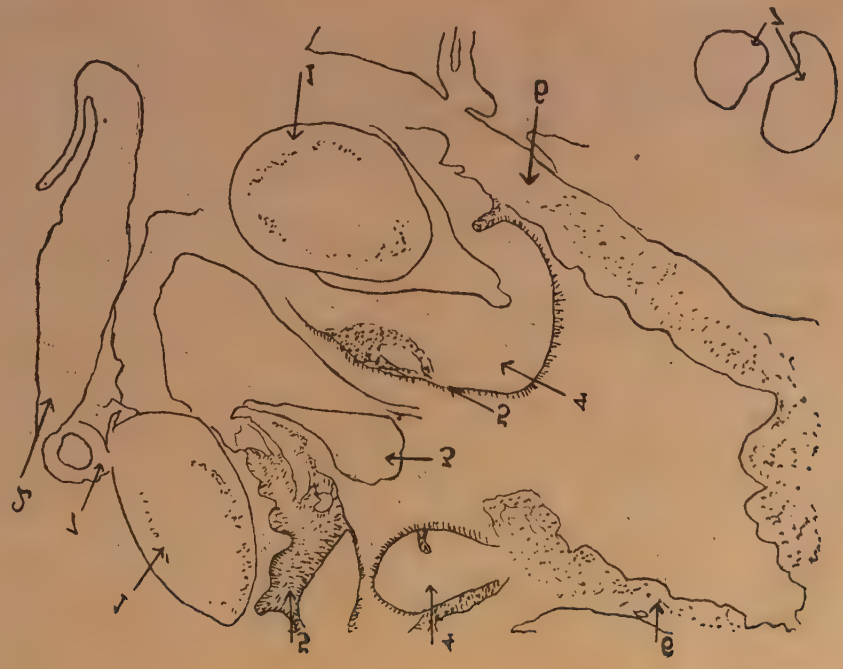


Fig. 10 Fotomicro de J. PINTO

Fig. 11

Fig. 12

Fotomicro de J. PINTO



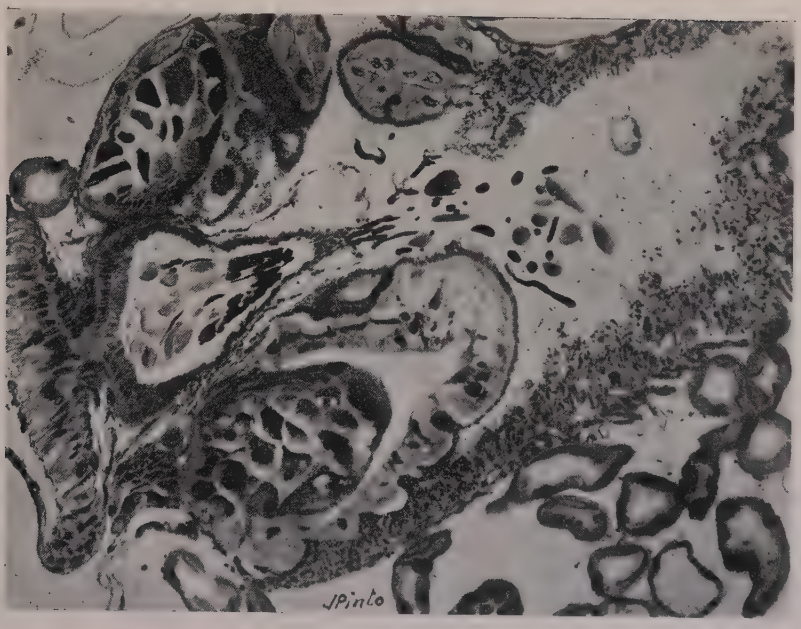


Fig. 11

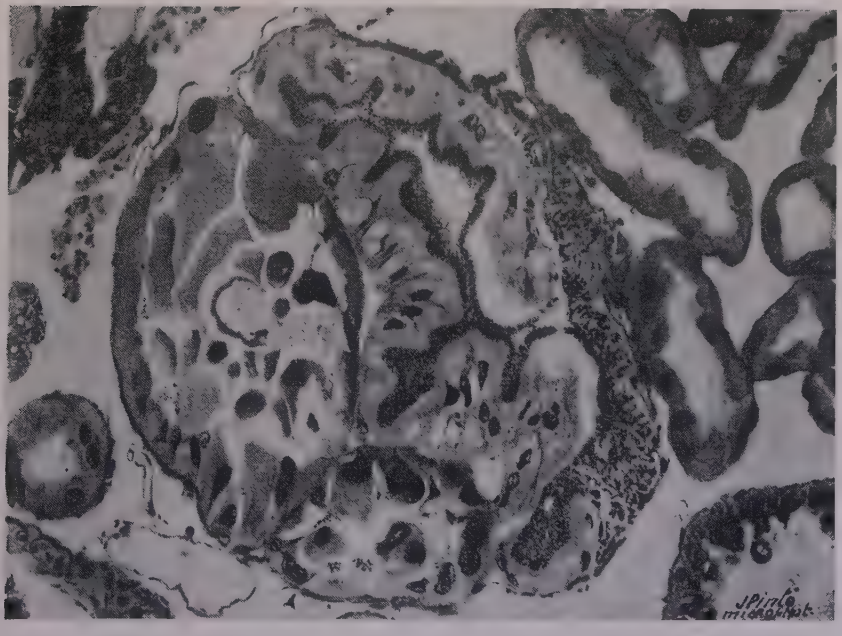


Fig. 12 Fotomicro de J. PINTO

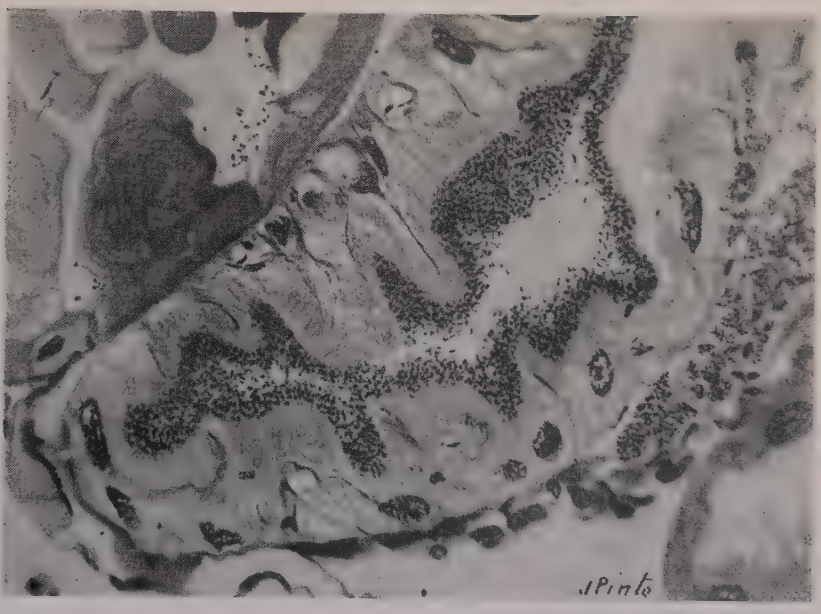


Fig. 13 Fotomicro de J. PINTO

A Fig. 14 B

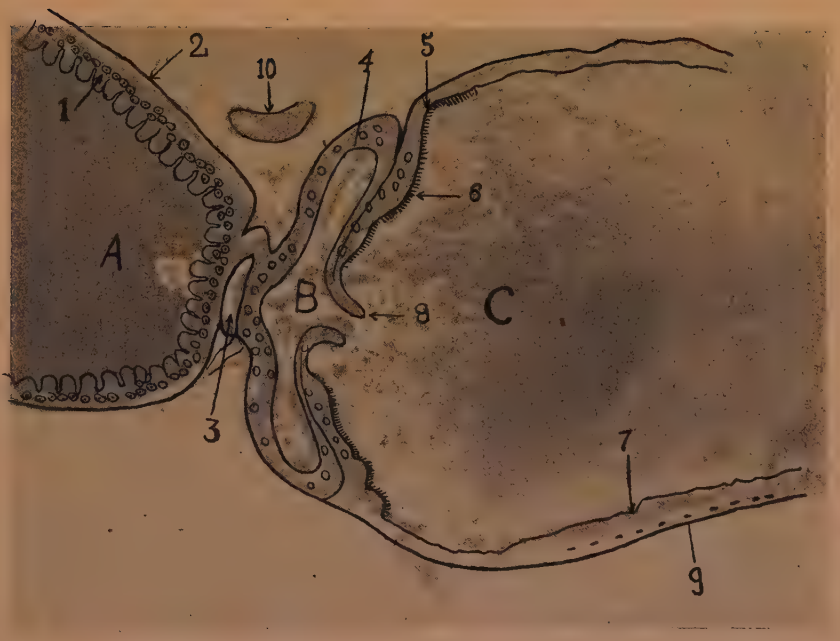


Fig. 15 Fotomicro de J. PINTO

A
B
C
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

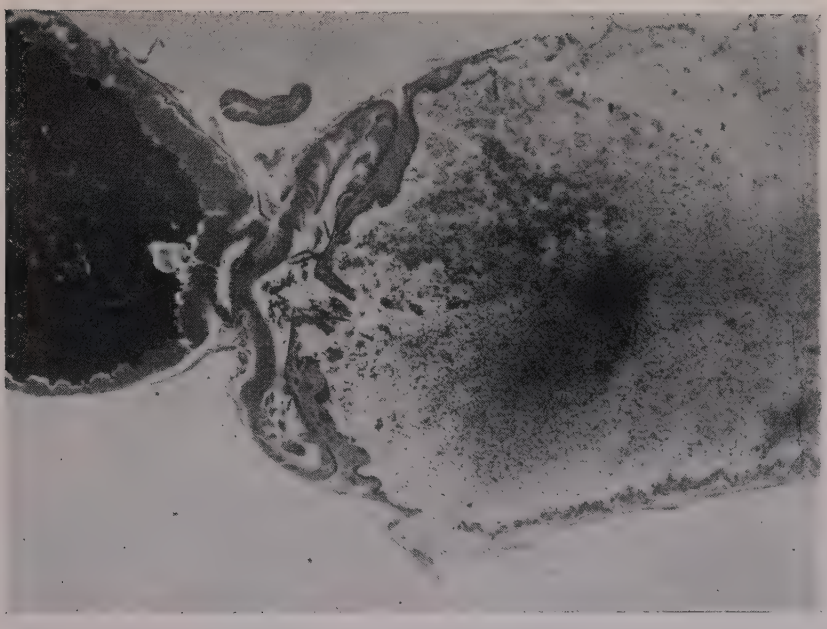


Fig. 15 Fotomicro de J. PINTO

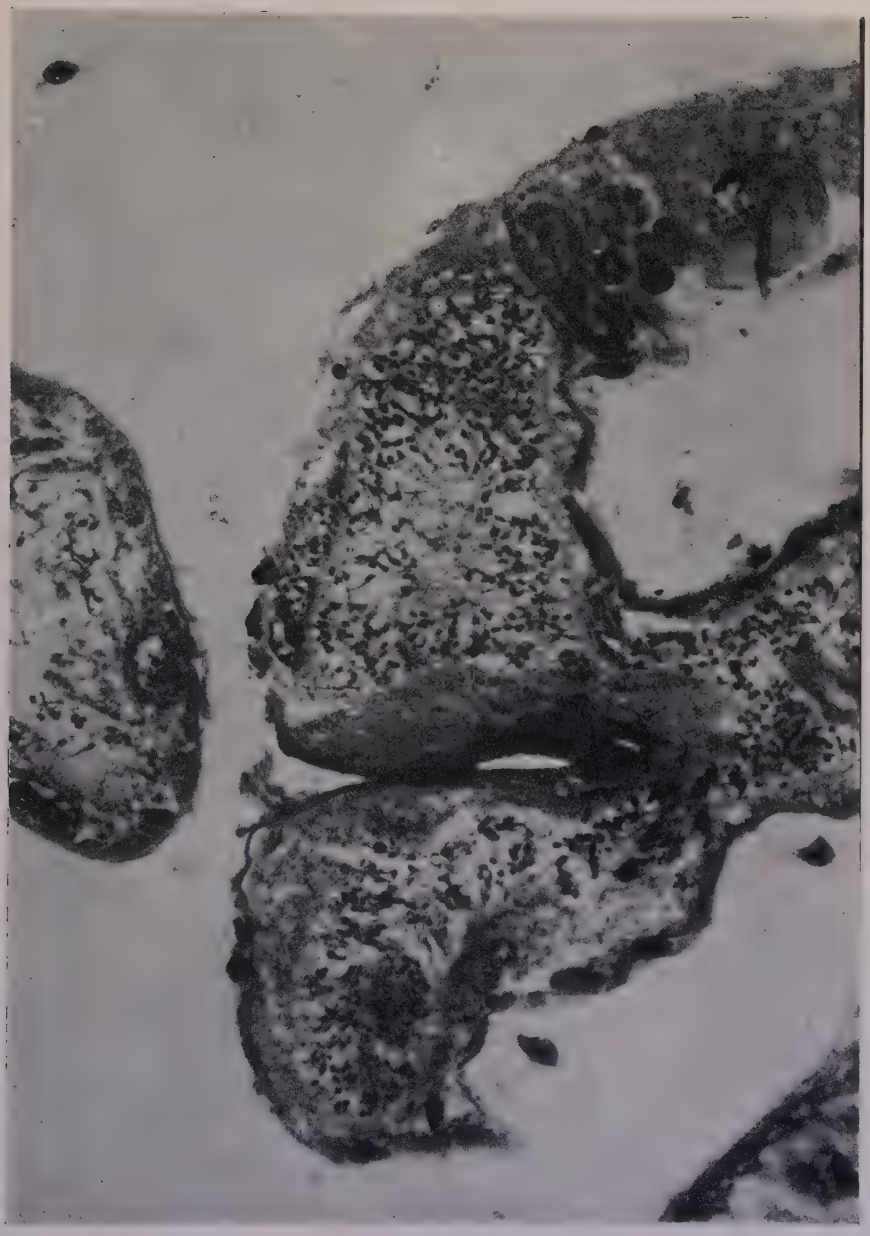


Fig. 16

Fotomicro de J. PINTO

Fig. 17

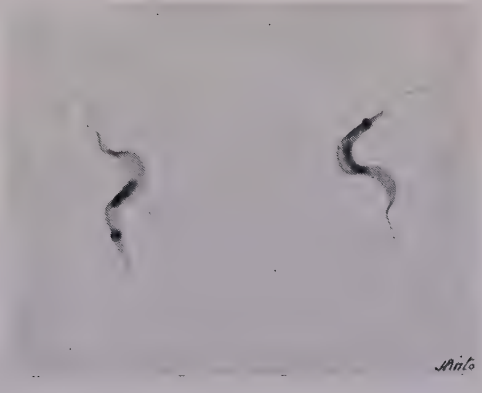


Fig. 18 Fotomicro de J. PINTO

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
27
28
29
26
36
30
37
43
31
38
44
32
39
45
33
40
46
34
41
48
35
20 μ
42
47
A. Pugas, del.

Fig. 19

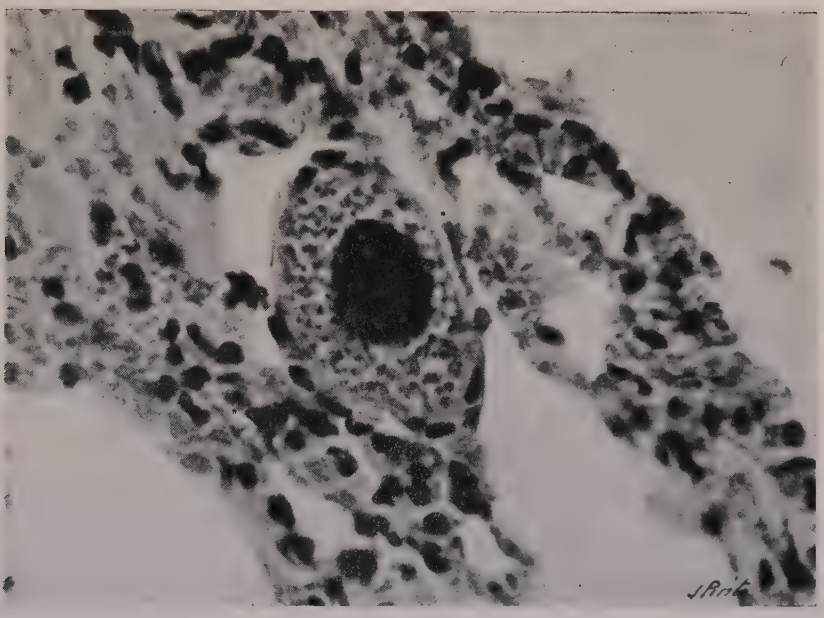


Fig. 20

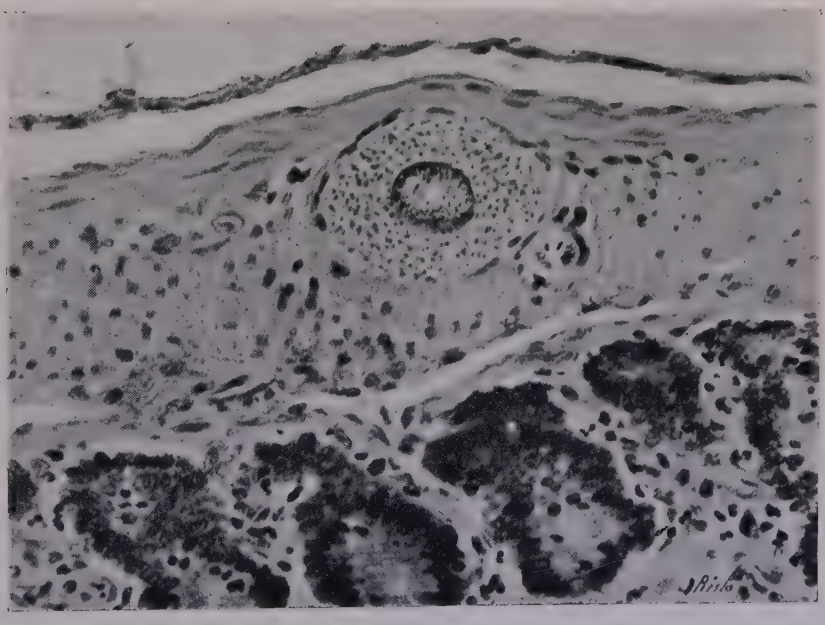


Fig. 21 Fotomicro de J. PINTO

Notas sobre especies brasileiras do genero Bufo (*)

pelo

DR. ADOLPHO LUTZ

(Com as estampas XIII—XXVII)

Os sapos verdadeiros do genero *Bufo* são quasi cosmopoliticos e representados no Brasil por oito ou mais especies já descritas, entre os quais ha uma das maiores. Conhecem-se facilmente pela péle sêca e aspera, cheia de verrugas, as extremidades curtas, que não permitem saltos grandes, os habitos terrestres e as côres pouco vivas. Caracteres adicionais e mais seguros são a ausencia completa de dentes, lingua livre posteriormente em grande extensão, tympano distinto, glandula *parotis* quasi sempre facil de ver-se e frequentemente muito grande, dedos sem discos, membranas interdigitais plantares moderadamente desenvolvidas. Muitas especies são caracterisadas por cristas osseas na face superior da cabeça que ajudam a distinguir as especies.

Ao contrario das rãs verdadeiras, os sapos teem a péle sêca. No dorso as glandulas mucosas parecem menos importantes do que as glandulas granulosas. A epiderme tende a corneificação e certamente não perde muito agua, o que explica, porque os sapos podem viver tanto tempo sem estar em contato com agua. Os dedos das mãos e pés podem ter as pontas pretas e corneas, as palmas e as plantas frequentemente mostram um induto igual; além disso ha tambem grande numero de papilas corneas que podem aparecer em ambos os sexos em forma de pontos pretos.

A maioria das especies mostram inclinação para variar e seus dois sexos podem diferir completamente e observam-se tambem formas melanisticas. Além disso cada individuo pode mostrar mudanças temporarias de coloração, o que dificulta a determinação.

Os sapos de genero *Bufo* são bastante protegidos pelas glandulas de veneno, a vida escondida e a coloração geral. A côr do lado dorsal lembra areia, argila ou terra. É verdade que pode haver, de preferenças nas femeas, manchas claras que podem chamar atenção. As manchas pretas, bastante espalhadas, são muito menos conspicuos e as colorações

(*) Recebido para publicação a 12 de Dezembro de 1933.

decorativas, bastante raras, como em outros batraquios são localisados de modo a ser escondidas no animal sentado. Que estas proteções nem sempre são suficientes, mostra a observação que um macho de *Bufo marinus* de 13 cm. de comprimento e côr bastante escura foi encontrado no estomago de uma cobra (*Xenodon merremii*).

As especies brasileiras já teem sido descritas varias vezes mais ou menos minuciosamente, sem todavia indicar especialmente os caracteres pelos quais se reconhecem mais seguramente e se distinguem uma das outras. Estes procurarei indicar e discutir tambem duas especies menos conhecidos. Convem tambem indicar como se distinguem os dois sexos na coloração e nos desenhos da péle. Falarei sómente de individuos quasi ou completamente adultos que frequentemente mostram escovas nupciais no lado interno dos 2 ou 3 primeiros dedos da mão dos machos. Conhecendo-se as especies adultas que prevalecem nos mesmos lugares, os individuos menores serão facilmente reconhecidos, a menos de serem completamente novos.

No genero *Bufo*, como em outros batraquios aparecem ocasionalmente individuos que excedem muito as medidas dos adultos, aptos á procreação. Isso mostra que nos animais citados o crescimento não pára com a maturidade sexual e que a duração da vida pode exceder muito a medida comum.

O nome *Bufo* compreende todos os sapos indigenos. Para algumas especies foram estabelecidos outros nomes genericos, que não eram bastante motivados e por isso não se conservaram.

LITERATURA

Parece superfluo de enumerar todas as publicações que citam sapos brasileiros. Limito-me á literatura mais importante desde do principio do seculo passado que cita tambem as publicações anteriores, dificeis de obter.

Dos autores que colecionaram no Brasil menciono primeiro o principe de Wied (N.º 1 e 2 da Bibliografia): As descrições de Wied são referidas nas obras de conjunto. A grande obra de Spix contem estampas em côres, acompanhadas de curtas descripções latinas das supostas especies por ele observadas que na realidade muitas vezes representam varios estados de idade e de sexo. Os desenhos são sofriveis tanto que o permitiu o estado de conservação do material, mas as qualidades e os contornos das côres absolutamente não merecem confiança. A indicação do habitat ainda hoje é de grande importancia para facilitar a determinação das especies. O material original de Spix foi

examinado, determinado e discutido depois de quasi 60 anos por Peters, o que aumenta consideravelmente o valor da obra de Spix. É claro que o material, embora bem guardado, ainda deve ter sofrido depois, mesmo si não foi alterado já antes da publicação de Spix o que é bastante provavel. As determinações de Peters podem ser consideradas como correspondentes á orientação atual; com tudo podem ficar algumas duvidas em relação a especies ainda não bastante conhecidas naquele tempo.

O que chama muito a atenção nos desenhos de Spix é que alguns deles mostram um tamanho imprevisto, como por exemplo o de *Bufo agua*, *Phyllomedusa bicolor* e *Bufo stellatus*; tambem o de *Rana gigas* (*Leptodactylus ocellatus*), deve ter sido um individuo gigantesco, porque nem o autor, nem Peters falam em aumento dos animais representados.

De obras de conjunto tenho de relevar especialmente as seguintes: Duméril & Bibron, Guenther, Boulenger e Nieden. De diferentes sapos brasileiros trataram varios autores cujas publicações eu enumero em ordem cronologica. Aqueles que dão bibliografias detalhadas são marcados com um asterisco. Baseados em observações proprias de animais vivos foram as comunicações de Hensel, Berg e Kati Fernandez; tambem Lutz, Miranda-Ribeiro e Lorenz Mueller fizeram uso parcial de material vivo. Os outros autores basearam-se em material conservado.

BIBLIOGRAFIA

1820 WIED, MAXIMILIAN — Reise nach Brasilien (1815-17).

1825-33 WIED, MAXIMILIAN — Beiträge zur Naturgeschichte von Brasilien.

1824 SPIX, J. B. — Animalia nova sive Species novae Testudinum et Ranarum, quas in Itinere per Brasiliam Annis 1817-20 . . . . .

1834-54 DUMÉRIL e BIBRON — Erpét. générale ou Histoire naturelle complète des Reptiles, Tome 9 et Atlas. — Paris.

* 1858 GUENTHER, ALBERT — Cat. of the Batrachia salienta in the collection of the British Museum, London.

1861 REINHARDT, J. e LUETKEN, CH. — Bidrag til kundskab om Brasiliens Pader og Krybdyr in: Vidensk. Meddel, naturh. For., Kjöbenhavn.

1867 HENSEL, DR. REINH. — Archiv für Naturgeschichte, Bd. I., Berlin.

1873 PETERS — Ueber die von Spix in Brasilien gesammelten Batrachier, Berlin, Monatsber. der Koenigl. Preuss-Akad. d. Wiss. 1872.

* 1882 BOULENGER, G. A. — Cat. of the Batrachia salientia in the Collection of the British Museum, 2. Edition by George Albert Boulenger, London.

* 1896 BERG, CARLOS — Batrachios Argentinos in: An. Mus. Buenos Aires, Vol. 5, Juan & Alsino, Buenos Aires.

1917 WANDOLLEK, DR. B. — Einige neue und weniger bekannte Batrachier von Brasilien (Leipzig).

1912 BAUMANN, DR. F. — Brasilianische Batrachier des Berner Naturhistorischen Museums. Zool. Jahrb. Abt. f. Systematik, Jena.

1927 MUELLER, LORENZ — Amph. u. Rept. d. Ausb. Prof. Bresslau's in Brasilien 1913-14. Sonderabdr. aus den Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Ges., Bd. 40, Heft 3.

1923 NIEDEN, Dr. Fr. — ANURA I, Das Tierreich, Bd. N.º 46.

1926 LUTZ, DR. ADOLPHO — New species of Brazilian Batrachians. Preliminary note. Trabalhos do Instituto Oswaldo Cruz, Manguinhos, Rio de Janeiro).

1926 MIRANDA-RIBEIRO, ALIPIO — Notas sobre Gymnobatrachios (Anura) Rio de Janeiro.

1927 KATI FERNANDEZ — Sobre la Biologia y Reprodución de Batracios Argentinos (Segunda Parte). Del Boletin de la Academia Nacional de Ciencias en Córdoba, tomo XXIX, pags. 271-328.

LUTZ, DR. ADOLPHO — Notas sobre Batrachios da Venezuela e da Ilha de Trinidad, Tomo XX-Fasc. (Gefolgt vom englischen Text, beide Texte auch separat).

BUFO MARINUS, PARACNEMIS E ARENARIUS.

As tres especies que discutirei em primeiro lugar são *B. paracnemis* Lutz, *B. marinus* Schneider, e *B. arenarius* Hensel. Foram ocasionalmente confundidos, mas podem ser facilmente distinguidos. *B. arenarius* tem as parotidas pouco largas, mas muito compridas, sendo a extremidade inferior separada em varias partes alongadas ou redondas. Isso basta para distingui-lo do *B. marinus*; além disso o *B. arenarius* tem as cristas cefalicas diferentes.

Tanto *B. paracnemis* como *B. marinus* teem as parotidas grandes e salientes cuja metade anterior se alarga consideravelmente e mostra numerosos póros bem visiveis. Em *B. paracnemis* ha tambem um complexo glandular no lado interno das pernas, que consiste em duas serias

longitudinais de glandulas redondas, facilmente palpaveis; contêm uma secreção com a mesma toxicidade e com o mesmo aspeto de sebo, como a parotida, pode facilmente ser expelida por pressão. A péle que cobre a *paracnemis* é geralmente uniformemente escura.

A glandula *paracnemis* a meu saber, não se encontra em outros Batraquios; apenas no *Bufo calamita* da Europa observam-se complexos glandulares nas extremidades, mais neste caso a localisação existe tambem nos antebraços.

CONSIDERAÇÕES SOBRE OS SAPOS CLASSIFICADOS DEBAIXO DO NOME B. MARINUS (SCHNEIDER).

A literatura sobre os sapos, registrados debaixo do nome *Bufo marinus* com os sinonimos *Bufo agua*, *Bufo ictericus* e muitos outros, começou ha perto de dois seculos e atualmente é tão vasta é tão difícil de obter como o exame dos tipos que serviram para as descrições. É pouco provavel que este trabalho havia de dar um resultado adequado.

Na literatura mais moderna os autores concordam em aplicar o mesmo nome aos sapos procedentes da America do Sul (excluindo a Patagonia e os países transandinos), da America Central e tambem das Antilhas. Já na Erpétologie de Dumeril et Bibron foi tentada uma subdivisão considerando a variabilidade na fórma das parotides, mas a conclusão foi que esta, no presente caso, não tinha valor especifico. Todavia os autores certamente reuniram mais de uma especie.

Na *Biologia Centrali-americana* Guenther registra que os exemplares da America Central não atingem o tamanho enorme atribuido a outros exemplares, por exemplo da Guiana.

Ha mais de quarenta annos, nos bairros mais baixos da cidade de São Paulo, um dos sapos, classificados geralmente como *Bufo agua* ou *marinus*, era tão abundante que, depois de escurecer, podia ser apanhado em grande numero debaixo das lanternas de gás, onde esperava os coleopteros lamellicornios que procuravam a luz.

Estudando o *Cystodiscus immersus* que descobri na vesicula biliar destes sapos e outros parasitos como o *Echinorhynchus Lutzii* v. Linstow, observei talvez uma centena destes sapos cujo tipo me ficou completamente familiar. Não se deve ter modificado nos ultimos anos, porém em consequencia de drenagem e outras alterações do terreno, os sapos tornaram-se muito raros. Vi todavia o mesmo tipo em outros lugares, por exemplo em Pindamonhangaba onde tambem apareceu em grande numero debaixo das lanternas publicas. A mesma fórma foi notada no Estado do Rio Grande do Sul por Hensel que salientou o dicroismo se-

xual, aliás já notado por Duméril et Bibron, sem conhecimento de sua natureza. Prevalece ao sul da cidade do Rio de Janeiro, mas é tambem encontrado mais para o norte.

Em 1911 apanhei uma femea tipica em Independencia, Estado de Paraíba, junto com *Leptodactylus vastus* Lutz. Numerosos sapos que tinha ocasião de examinar em Trinidad não se distinguiam absolutamente dos *B. marinus* do sul do Brasil. Ao contrario do *B. crucifer* nunca vi o *marinus* nos jardins da capital, mas aparece já a poucas leguas de distancia, por exemplo em Bangú.

Lorenz Mueller descreveu maior numero de *Bufo marinus*, colhidos por Bresslau em varios lugares, mas todos pequenos ou meio crescidos. O que ele chama de Bufo *marinus marinus* não está bastante definido. Prefiro chamar a fórma, encontrada de preferencia ao Sul do tropico do capricórneo: *fórma de Hensel*. O seu comprimento pouco excede 12-13 cm.

Nesses ultimos seis anos recebi pelo obsequio do Dr. Octavio Magalhães, diretor do Instituto Ezequiel Dias em Belo Horizonte, maior numero de sapos procedentes do Estado de Minas. Pertenciam a duas especies aparentemente novas, das quais em 1926 dei uma descrição preliminar, chamando-os *B. paracnemis*, e *B. rubescens*. Notava-se uma ausencia completa da fórma de Hensel, geralmente abundante lá onde ocorre. *B. paracnemis* é muito maior, sendo o comprimento dos exemplares maiores de 18-19 cm. contra 12-13 cm. no *marinus*. As manchas escuras do *paracnemis* são geralmente mais numerosos, de modo a tornar a face dorsal mais uniforme.

Os machos que seguiam geralmente o mesmo tipo, alcançavam pouco mais de 2/3 do comprimento das femeas. Os dous sexos mostravam na face dorso-lateral interna da tibia uma glandula longitudinal composta que chamo *paracnemis*, em analogia com a glandula *parotis*. A designação parotoide é um soloecismo, já introduzido ha tempo e copiado por muitos autores, mas que não deve ser conservado. As paracnemides que já se observam em exemplares novos, embora menos desenvolvidos, são caracteristicas da especie. As parotidas variam um póuco em tamanho e fórma, mas são geralmente relativamente menores que no *Bufo marinus*. Em ambos teem uma fórma ovalar especialmente larga e teem o eixo longitudinal obliquo, principalmente em *paracnemis*.

Em 1928 tive a surpresa de constatar em Natal a existencia de um *Bufo paracnemis* tipico e ultimamente o Dr. Afranio do Amarel me disse, têr recebido do Noroeste de São Paulo uns sapos que se pareciam com minha descrição do *B. paracnemis*. Teve a bondade de mandar-me em Outubro e Novembro 1932 um material abundante de sapos vivos,

procedente de muitos logares do Noroeste de São Paulo, tambem um de Minas e outras do Oeste de Matto Grosso. De informações orais conclui que a especie se extendia tambem ao Chaco, o que fica corroborado por um exemplar do Chaco, citado por Berg, que tinha o comprimento enorme de 19 cm. Este póde ser considerado extraordinario, mesmo para uma femea de *paracnemis*. Berg, talvez por causa do desenho e da côr considerou o exemplar como macho de *marinus*, o que deve ser um engano, porque o *Bufo marinus* nunca atinge este tamanho. Ultimamente recebi do Professor Salvador Mazza varios exemplares do Norte da Argentina, região de Jujuy. Pedi ao Professor Barbour do Museu do Zool. Comp. em Boston informações sobre os exemplares ali existentes de *Bufo paracnemis*. Reconheceu que lá havia as duas especies mencionadas.

As informações de Benjamin B. Leavitt indica que o Museu de Boston contem exemplares de *Bufo paracnemis* com os rotulos seguintes:

Ceará, Brasil,
Rio Poty, Brasil (Rio Grande do Norte);
São Gonçalo, Brasil (Rio Grande do Norte);
Januaria, Brasil (Minas Gerais);
Minas Gerais, Brasil.

Ultimamente recebi de Dom Pedro Pickel material vivo do estado de Pernambuco, a saber uma femea adulta de 700 gramas de peso e 17 cm de comprimento, colhida em Olinda e alguns individuos meio crescidos de Tapera. Todos pertenciam induvidavelmente a *B. paracnemis*.

Tudo leva a acreditar que o *Bufo paracnemis* ocupa uma zona transversal que passa de Ceará a Natal e Pernambuco sobre o Norte de Bahia, Minas Gerais e Noroeste de São Paulo até ao Chaco e a Provincia de Jujuy. Faltam informações sobre a ocurrencia do paracnemis mais para o Norte da America meridional como tambem na America Central e as Antilhas. Apenas da Guiana foram citados exemplares que pelo tamanho deviam pertencer antes ao *B. paracnemis* do que ao *marinus*. Tambem a figura, dada por Spix, de um *Bufo agua* do Rio Negro que atinge a longura extraordinaria de 23 cm. se póde referir a *B. paracnemis*. O mesmo vale para os exemplares grandes procedentes do Pará, citados por Baumann.

Os machos adultos podem ser diferenciados das femeas por varios caracteres: em primeiro logar pela vesicula vocal mediana bastante larga que se faz aparecer titilando a barriga, o que induz o macho em tempo de cio a cantar num tremolo baixo. A região gular e densamente pon-

tilhada de escuro chegando a ser negra. As verrugas glandulares, ás vezes tambem seus intervalos, pelo menos no cio, são coroados com pontas corneas negras em toda a face ventral incluindo as extremidades, ficando a péle muito aspera e contato. As manchas pretas são menores e menos intensas nas costas, mas a vermiculação negra da barriga é mais acusada.

Quasi todos os machos são marbreados como as femeas. Apenas de S. Anastasio recebi dous machos que eram do côr mais uniforme pardo-olivacea, como é a regra para o *Bufo marinus*. Distinguiam-se todavia pela paracnemis bem destacada e eram acompanhada por uma femea tipica. Não estavam em tempo de cio e um dele não era completamente adulto. O maior macho vivo tinha 14 cm. de comprimento. As paracnemides eram muito grandes.

Além do tamanho e da *paracnemis* ha outras distinções entre o *Bufo paracnemis* e o *marinus* do Sul. O primeiro parece relativamente mais largo e o eixo longitudinal das parotidas é mais obliquo, sendo o angulo de divergencia com o eixo do corpo maior. A côr tanto das manchas escuras como das claras é mais forte e as dimensões menores do que o comprimento da *paracnemis*. No *B. paracnemis* o numero das manchas escuras é maior e o tamanho menor do que em *marinus*. Em ambas as especies as cristas supraorbitais não formam angulo.

A *paracnemis* é geralmente facil de verificar em individuos adultos, quando as glandulas componentes são cheias e deixam exprimir a secreção por pressão. Parece-se completamente com aquela da parotida. Em animais menores a *paracnemis* não é tão distinta, mas geralmente se póde verificar o conteúdo. Em outros especies a péle da mesma região póde ser espessado, mas a pressão não fornece secreção.

Em principio de Outubro recebi do Dr. Nelson Davis um sapo de Piraja (Baía), cujo comprimento era de 162 mm., e o peso de 350 gramas. Tem a paracnemis bem acentuada. O dorso a principio quasi uniformemente negro, depois mostrou manchas pretas bem largas sobre fundo claro, (branco amarellado sujo ou esverdeado). Toda a face ventral do tronco, incluindo as extremidades, era coberta de vermiculações pretas e largas, lembrando exemplares de *Leptodactylus pentadactylus*. O tympano com o campo retrotympanico era preto. A crista parietal está excepcionalmente bem desenvolvida, e as pontas parecem ligadas para uma crista mais aredondada. O exemplar de Baía como tambem o do Olinda mostram as manchas pretas muito maiores do que os individuos de Estado de São Paulo. Assim se parecem mais com *marinus* mas a sua determinação é garantida pela paracnemis bem acusada.

VARIAÇÕES E DIFERENÇAS SEXUAIS DO *BUFO MARINUS*

Na maioria das femeas a face superior mostra grandes manchas pardacentas, separadas por uma faixa vertebral mais clara, e zonas transversais semelhantes; o lado ventral mostra apenas uma fraca vermiculação escura. Em zonas mais elevadas, como Teresopolis, Itaipava, Novo Friburgo e São João no Estado de S. Catharina podem aparecer exemplares um tanto melanisticas em que as grandes manchas dorsais tornam-se pretas e em parte confluentes. Podem tambem ficar menores e mais numerosas lembrando aos do *Bufo paracnemis*. O desenho dorsal póde extender-se ás margens do ventre e ao lado inferior das pernas que então parecem variegados de preto. O dorso das extremidades posteriores pode mostrar faixas transversais escuras que aparecem tambem numa parte dos exemplares mais normais.

Os dois sexos de *marinus* e *paracnemis* podem ser cobertos de verrugas glandulares que são mais escuras do que o resto da péle. Em tempo de cio aparecem tambem muitas pontas pretas corneas sobre e entre as verrugas. As palmas e plantas tornam-se pretas por um inducto corneo e nos machos aparecem escovas de copulação ao longo dos dous primeiros dedos. Esta pigmentação e transformação cornea é mais acusada nos machos dos sapos grandes; a vermiculação da face ventral é mais acusada e a gula parece distintamente enegrecida.

Bufo marinus ocupa um territorio muito mais vasto que se extende das margens do Rio da Prata para Rio Grande do Sul. Hensel observou o *marinus* no Rio Grande do Sul e deu uma boa descrição que corresponde ao typo comun. Existem variedades mas não são tão pronunciados como a diferencia entre os dous sexos. O macho, caracterisado pelo saco vocal, tem o dorso unicolor, acinzentado ou pardo esverdeado. A femea sempre tem nas costas grandes manchas escuras, separadas por espaços mais claros e geralmente uma faixa clara vertebral. Tudo isso aparece nas ilustrações e dispensa uma nova descrição dessa especie tão comun e geralmente tão abundante e apanhada facilmente ao anoitecer. As femeas producem um numero enorme de ovos pequenos dos quais nascem gyrinos miudos que se transformam logo, de modo que a fórma perfeita é extraordinariamente pequena, contrastando com o tamanho dos adultos.

Uma distinção principal entre *paracnemis* e *marinus* é o facto que no primeiro a coloração dos dous sexos pouco se distingue, emquanto que no *marinus* são completamente diferentes, porque as manchas maiores se observam apenas nas femeas, sendo os machos unicolores, ou pardo-olivaceos. No *paracnemis* os machos parecem variegadas com manchas menores que das femeas.

BUFO ARENARIUS HENSEL. — As indicações na bibliografia desta especie nem sempre são acertadas e os exemplares originais de Hensel não eram muito mais do que meio crescidos. As cristas cephalicas não distinguem a especie e a mancha preta do peito, indicado por Hensel, falta em todos dos meus exemplares, procedentes de varios lugares. A coloração e o desenho são muito variaveis e podem aproximar-se aos de *marinus*, ora aos de *paracnemis*. Felizmente o exame das parotidas não deixa duvida sobre a classificação da especie, o que é tanto mais importante que *marinus* e *arenarius* não se distingue claramente pelas dimensões como constatei em individuos vivos e mortos. Além disso podem ser encontrados no mesmo lugar.

B. arenarius prevalece nas republicas platinas e se extende tambem sobre o Estado brasileiro de Rio Grande do Sul, onde coexiste com *B. marinus*. Com este tem sido confundido ocasionalmente; outras vezes considerado apenas como variedade separada (Duméril e Bibron, Espada). Possuo exemplares de Montevideo e Buenos Aires e alguns mais jovens da região montanhoso do Rio Grande do Sul. São geralmente um tanto menores do que *B. marinus*, mas podem ser bastante parecidos com ele, mostrando diferenças sexuais correspondentes. Tenho uma aquarela de um macho unicolor de Montevideo, mostrando distintamente uma côr olivácea clara do fundo. Esta especie, onde ocorre, é geralmente muito abundante. Distingue-se claramente de *marinus* pelas parotidas estreitas e alongadas. Na parte posterior dissolvem-se em verrugas glandulares redondas ou alongadas. Frequentemente se distingue por uma côr mais clara.

Na parte superior a parotida pode ser um tanto alargada e pode mostrar poros, mas sempre se distingue facilmente das parotidas excessivamente largas das outras especies. O desenho das femeas aproxima-se da especie *marinus* sendo geralmente menos acusado. Algumas femeas são quasi unicolores. A pigmentação da gula dos machos é menos constante que nas especies acima citadas. De outro lado ha machos cujos desenhos seguem o typo feminino. Estes são facilmente reconhecidos porque geralmente basta segural-os para produzir os sons caracteristicos e uma dilatação ligeira do saco gular.

O meu material anterior procedia de Montevideo e do Estado Rio Grande do Sul. Ultimamente recebi do Professor Houssay de Buenos Aires exemplares mortos e vivos desta localidade, que me familiarisaram mais com os caracteres desta especie. Havia entre elles uma femea de 14 cm. de comprimento com 320 gramas de peso e alguns machos mostrando em parte manchas claras arredondadas como prevalecem nas femeas. Em ambos os sexos as manchas claras podem tornar-se indistintas

ou desaparecer de todo. Machos e femeas podem mostrar um tom ligeiramente esverdeado ou azulado, principalmente nas manchas claras.

HIBRIDISMO

Considerando as afinidades grandes das tres especies, impõe-se naturalmente a questão, se não existem hibridos. Até hoje não ha indicações neste sentido. Geralmente numa dada região só existe uma das tres especies mencionadas. Apenas no Sul do Brasil e nos Estados Platinos os territorios de *Bufo marinus* e *arenarius* confluem, pelo menos em parte. Todavia as parotidas dos exemplares examinados não mostram transição entre os dois tipos.

Não é muito raro que varios tipos da mesma procedencia mostrem particularidade de desenho e coloração que lembram os tipos de outras especies, não existentes nesta região.

Visto a enorme fecundidade das especies de Bufo é permitido supôr que tais exemplares sejam descendentes dos mesmos pais.

BUFO RUFUS GARMAN

O nome *Bufo rufus*, estabelecido por Garman, não aparece na monografia de Nieden, nem foi mencionada na literatura, com exceção de uma nota de Barbour e Loveridge, indicando a existencia de alguns exemplares, já bastante descorados, no Museu de Zoologia Comparativa.

Não pode haver duvida que a especie de Garman seja identica com aquela que descrevi cincoenta anos depois, debaixo do nome *B. rubescens*. Os primeiros exemplares conhecidos procediam de Goyaz em quanto que os meus vinham do Estado de Minas. Isto não tem maior importancia, visto que os dous são limitrofos em grande extensão.

A extensão da côr vermelha o avermelhada é variavel, mas nunca parece faltar completamente em individuos adultos. Assim estes não podem ser confundidos com outras especies sulamericanas nas quais esta côr sempre falta, apenas com exceção de certas variedades de *B. crucifer*.

As membranas natatorias ás vezes, são de um vermelho vivo, pelo resto as dimensões indicadas bastam para evitar a confusão dos adultos com *B. crucifer* do mesmo sexo. Tambem ha diferenças bem acusadas nas cristas da cabeça.

A crista parietal é curta e não diverge para dentro. No *B, rufus* uma crista ocipitoparietal falta completamente, a parotida é alongada e toca diretamente á crista ocipitotimpanal alargada, como o faz tambem o timpano. Assim, a especie se distingue claramente de *B. crucifer*.

Miranda Ribeiro dá uma figura colorida de uma variedade que ele chama *roseanus*, que talvez podia referir-se ao um exemplar menor de *B. rufus*; infelizmente falta indicação de procedencia. Ultimamente examinei duas femeas tipicas procedentes de Arantes no Estado de Minas e pertencentes ao Dr. Afranio de Amaral. Uma delas mostra bem distintamente cintas transversais escuras sobre o dorso das extremidades, manchas escuras menos distintos, sobre o dorso e tambem os flancos e todo o lado interior das pernas muito variegado por manchas claras ou escuras.

B. rufus, de que examinei ca. de quinze exemplares, alcança um comprimento e uma largura maior do que os maiores exemplares do mesmo sexo de *B. crucifer*. Os machos atingem um comprimento de 8-9 cm. as femeas um de 13 cm. O primeiro dedo é claramente mais comprido do que o segundo, e tem a base um tanto espessada. A membrana natatoria entre o terceiro, quarto e quinto dedo de pé é bem desenvolvida e alcança a metade da altura do dedo menor. Os calos metatarsães são ambos conspicuos. Os lados do tronco e, principalmente, o lado interior das pernas é finamente marbreado. O ventre é completamente branco ou apenas salpicado de preto em pequena extensão. As verrugas da pele podem ser bem desenvolvidas, mas não ha paracnemis. Em seguida dou uma copia da descrição original de *B. rufus* de Garman e a minha descrição independente feita do meu *B. rubescens* em 1925.

DESCRIPTIONS

Bufo rufus:

From near Goyas, on the highlands of East-Brazil, we have two specimens of a toad agreeing with this in size and outline which has been named *Bufo rufus* on account of the red color on the hinder half of the body. It differs principally in the small points or granulations which cover the ventral surface, in the paratoids which taper less and are more widened posteriorly, and in the coloration, which is a light rusty brown with indistinct spots of darker on the back, narrow transverse bands of the same on the legs, from the knee to the toes, and with the hinder parts, in life, tinted with red. The differences are certainly sufficient to mark these specimens as belonging to a distinct variety, and most probably other collections from this region will establish them as of specific value.

Bufo rubescens:

Length of male 8-9, of female up to 13 cm. Both sexes covered with lenticular warts with corneous points in the male, which may

show black nuptial brushes on the three first fingers. Upper side brown or olivaceous while the underside is white,, very slightly mottled with black. The sides are more or less mottled. Sometimes dark cross bars appear on the limbs. Most peculiar is the brickred colour of the cephalic crests and the limbs which may also appear like a rash on the ventral side and on the long and narrow parotids. The supra and retroocular crests join without forming an angle. Tympanum constantly oval.

(I have observed more than fifteen individuals sent from the Institute in Belo Horizonte through the director Dr. Octavio Magalhães).

BUFO D'ORBIGNYI

Duméril e Bibron descreveram um exemplar de 7 cm, de comprimento, colhido por d'Orbignyi em Montevideo. Como outros sapos, tambem esta especie é muito variavel; o seu comprimento não parece exceder 7 cm. Uma estria dorsal clara (que alguns autores descreveram como amarella) é muito frequente. A côr do fundo dorsal nos exemplares conservados varía de ochraceo para pardo ou negro. Duméril e Bibron chamam o colorido olivaceo e notam uma estria dorsal amarela e o lado ventral branco. Mertens que observou dois exemplares vivos mandados de Porto Alegre, não menciona uma côr verde, que talvez seja um fenomeno nupcial. O dorso pode mostrar manchas escuras, analogas ás observadas em outros sapos. As extremidades tambem podem mostrar faixas dorsais escuras, as vezes abreviadas. As regiões laterais podem ser salpicadas de preto e branco.

Esta especie é distribuido sobre Uruguay, Argentina e Paraguay, mas tambem sobre o Estado de Rio Grande do Sul. Muitas vezes citada, mas raras vezes descrita minuciosamente, até ha pouco, parece ter sido figurada apenas por d'Orbignyi.

De Montevideo, onde observei a especie viva, ha já muitos anos, tenho apenas exemplares conservados, pequenos, mas que correspondem ás descrições. O exemplar que serviu para ilustração na estampa 23, procede de S. Francisco de Paula onde foi apanhado pelo Dr. Pinto. Trata-se de um macho adulto com comprimento de 6,3 mm. e difere um pouco na forma das cristas corneas e mostra um certo degráu de melanismo, aparecendo principalmente no desenho pigmentado do lado ventral. Tambem o tamanho do timpano e suas relações com as partes visinhas são um tanto diferentes como mostra a figura na estampa XXIII. Não se deve concluir que se trata de especie nova, mas sim de uma variação que mostra que tambem estes caracteres são sujeitos ao variações.

Hensel viu numerosos exemplares de Porto Alegre cujo maior

media 66 mm. Berg, cujos exemplares não passavam 60 mm, dá uma bibliografia detalhada até 1896.

Os meus exemplares do Rio Grande do Sul são escuros com desenho que dá pouco na vista. Differem do *B. arenarius* pela crista parietal dirigida para a dentro e pelas parotidas muito mais curtas; a cabeça é curta com focinho obtuso e arredondado. A margem do queixo superior é um tanto alargada, principalmente da parte posterior e aparentemente revirada para cima. Kati Fernandez discute detalhadamente o *B. d'Orbignyi* de La Plata e seu desenvolvimento, menciona uma coloração verde escura sobre fundo escuro e dá o comprimento de 60 mm.; acompanha a descrição com algumas fotografias pequenas, mostrando principalmente as verrugas. A face ventral mostra geralmente granulos brancos sobre o fundo cinzento ou vermiculações escuras bem distintas como no exemplar figurado por mim.

Exemplares vivos de *B. d'Orbignyi*, mandadas de Porto Alegre, teem vindo para Alemanha nos ultimos dez anos e ocasionaram publicações no popular jornal «Zeitschrift für Aquarien- und Terrarienkunde», [Jahrgang 35, 1924, Seite 192, (Fritz Molle), Jahrg. 37, 1926, N.° 3, Seite 5, (Robert Mertens)]. Foram acompanhados de desenhos simples. Das observações, feitas nelas, convêm relevar que a côr verde foi observado num animal vivo por Molle.

BUFO GLOBULOSUS (GRANULOSUS) SPIX.

Esta especie se caracterisa por tamanho menor (comprimento 5-5,5 mm.), uma côr geral de ardósia composta de manchinhas claras e escuras e integumento finamente granuloso que rende as cristas osseas da cabeça e as parotidas alongadas menos distintas. O focinho, um pouco saliente entre as narinas, é troncado na extremidade. A cabeça em conjunto, vista de cima, forma um triangulo com o angulo anterior, ligeiramente agudo. Em perfil retrocede para a fenda buccal; é achatada entre os cristas canthaes sopraorbitais; as margens laterais do tronco alargam-se pouco á pouco, de modo, que visto de cima e de baixo o contorno do animal parece piriforme.

Toda a face ventral tem o fundo cinzento claro com granulos brancos; uma faixa vertebral, dorsal falta ou pouco aparece, manchas escuras são frequentes no dorso, mas pouco distintas. As mudanças de côr são pouco apreciaveis. Dos meus exemplares um de Campos indica o limite meridonal, e outros de Maracay, Venezuela, a zona mais septentrional observada. Na Baía e em Rio Grande do Norte aparecem frequentes; ocorrem tambem em Paraguay e no Norte da Argentina. O meu trabalho sobre os Batrachios de Venezuela e Trinidad (1927) contem uns

bons desenhos do aspecto dorsal e ventral, tirados por P. Sandig de um macho de Venezuela; estas foram aproveitados para a estampa XXV.

Faixas transversais escuras podem tambem aparecer no dorso das extremidades. A gula do macho aparece amarelada ou enegrecida.

Apenas em tempo bem chuvoso ouve-se a voz caracteristica desses sapos. Parece-se com o ruido que se produz agitando ervilhas secas num sacinho, e os sapos mesmo deixam os seus escondrijos.

O nome « *Bufo globulosus Spix* » como relevou Berg. tem prioridade sobre granulosus; foi ignorada pela maioria das autores, talvez porque designou um exemplar deteriorado e por isso deixa de ser caracteristico. A meu ver não existe perigo de confundir este sapo com outras das mesmas regiões.

BUFO CRUCIFER WIED.

O Bufo, hoje geralmente registrado sob o nome acima, aparece em variações diversas, que se podia facilmente considerar como especies diferentes, se procedem de lugares afastados. Isto tambem se deu com bastante frequencia e causou uma sinonimia ampla, registrada detalhadamente nas publicações de Berg e Nieden. Wied indicou o nome crucifer, mas considerou a especie identica com *Bufo margaritifer*, Laurenti. Com tudo ele se referia a descrição de Daudin. O nome sempre foi usado para designar o *Bufo typhonius*. Wied deu descrições mais detalhadas sob os nomes *B. ornatus*, *Spix* e *cinctus* Wied (1825). As gravuras do *cinctus* (1831) são distintas. Não parece ter mantido o seu nome *crucifer*, mas usou o nome de *ornatus* Spix.

Spix indicou cinco nomes para cinco especies brasileiras que ele considerou diversos, mas Peters que examinou os typos em 1872 os colocou todos em *crucifer*:

É muito dificil dar uma descrição do *Bufo crucifer* porque todos os caracteres indicados para as diferentes formas, ou não teem valor ou são inconstantes, e com poucas modificações se encontram nos varios tipos.

Bufo crucifer é uma especie comun que em variações diversas se extende sobre a maior parte do Brasil. Differe muito em tamanho e coloração, mas é na media menos voluminoso e mais esbelto que *paracnemis*, *marinus* e *arenarius*. As cristas osseas da cabeça são bem desenvolvidas, mas sem ter nada de bem caracteristico.

A crista parietal pode ser apenas indicada ou excepcionalmente bem desenvolvida. A margem da maxila superior é distintamente alargada principalmente para tráz e de côr mais clara. As parotidas varíam em sua

fórma, mas são sempre curtas e geralmente estreitas, com exceção da parte anterior; tambem não são muito salientes. As verrugas do lado dorsal são frequentemente muito abundantes, mas a corneificação é geralmente menos acusada que nas especies já citadas. O lado ventral é sempre densamente coberto de granulos finos.

Me parece conveniente começar a descrição da especie com enumeração e discussão das variações que conduziram aos diferentes nomes. Estes podem ser juntados ao nome *crucifer* para designar os diferentes tipos. Com tudo precisa lembrar-se que estes tipos se podem confundir. O primeiro tipo que chamo *Bufo crucifer inornatus*, não é raro no Rio de Janeiro e na visinhança do Instituto. No mez de Agosto examinei um grande numero de exemplares, pela maior parte machos adultos que todos pertenciam a este tipo; tambem os exemplares conservados de tempos anteriores mostravam agora claramente o mesmo tipo. O comprimento desses sapos alcançava 9-10 cm; as femeas são geralmente maiores, excecionalmente ha individuos que chegam até 13 cm. em comprimento. A côr da face dorsal é muito variavel e pode ser considerado geralmente como protetiva, imitando a coloração de varias especies de solo, areia, argila de varias qualidades, terra de jardim ou folhas sêcas. Todo o lado superior tem esta côr e apenas as extremidades mostram indicações de faixas transversais mais escuras. As faces laterais do tronco e o lado interior das coxas não mostram desenho decorativo, mas pode haver algumas manchas escuras. A face ventral é sempre mais clara, cinzenta ou branca, mostrando poucas manchas indistintas mais escuras; uma estria dorsal clara, tão comun em outras fórmas, póde faltar completamente ou ser apenas ligeiramente indicada.

Tambem o timpano com a região visinha pode mostrar a mesma côr terrea, mas frequentemente mostra uma pigmentação mais forte que pode se tornar muito intensa e extremamente caracteristica. Deu ocasião para o nome *melanotis* que seria muito significativo, si fosse constante; consiste em uma pigmentação não somente do timpano, mas tambem do campo visinho, tanto em frente como ainda mais largamente atraz; pode ser apenas um vermelho pardocinzento escuro; para *melanotis* tambem se cita uma estria dorsal clara. A este tipo correspondem muitos exemplares do Rio, comtudo ele se combina com outros tipos descritos sob nomes diversos. O campo timpanal preto frequentemente se alonga para trás, seja apenas em fórma de estrias ou manchas ou como faixa larga completamente preta até a extremidade posterior do tronco. O ultimo caso é dado como caracter principal do *B. cinctus* de Wied. Mas aqui acedem caracteres novos entre os quais convem salientar principalmente manchas amarelas nas ilhargas e no lado interior das coxas.

Wied dá uma descrição detalhada, acompanhada de estampa colorida de um macho e de uma femea. Encontrava o *B. cinctus* principalmente em Espirito Santo, especialmente na região de Victoria. Não tenho material de lá mas recebi por gentileza do Dr. Nelson Davis em fim de Agosto e em principio de Setembro 45 exemplares de um Bufo de Baía, que sem a menor duvida represente o mesmo tipo chamado *cinctus* por Wied. É constante a côr variegada de amarelo nos lugares comuns (ilhargas e face interna das coxas), frequentemente as manchas amarelas, são encontradas em extensão ainda maior. A coloração dorsal desta fórma era de preferencia côr terracota clara, mas se modifica frequentemente durante a observação. A côr amarela aparece geralmente em manchas arredondadas ou alongadas, que não são muito brilhantes, sendo de côr de enxofre. As faixas transversais escuras eram muitas vezes bem distintas. A estria dorsal branca ou terminando em amerelado era geralmente larga e ás vezes tarjada de preto. A cabeça incluindo as palpebras superiores e as parotidas, como tambem as partes marginais do dorso, muitas vezes eram distintamente mais claras. A face dorsal das coxas frequentemente era enegrecida em grande extensão e nos lados da superficie ventral havia vermiculações escuras. Os exemplares, durante uma observação prolongada, podem mudar bastante de côr e seria impossivel dar uma idéa clara dessa forma descrevendo apenas individuos isolados com todas as minucias. Meus exemplares do Rio de Janeiro não mostravam côr amarela que correspondia aquela do *cinctus*, excetuando uma femea na qual apareciam manchas amarelas distintas durante o tempo de observação.

BUFO CRUCIFER VAR. STELLATA (BUFO STELLATUS SPIX)

Esta fórma foi recebido em um exemplar grande e dois pequenos procedentes de Caruarú (Est. de Pernambuco), colecionados por Dom Pedro Pickel. O exemplar grande é macho e alcança o comprimento de 8,5 cm. Combina com o *crucifer* comun nas cristas cefalicas e o campo preto, incluindo o timpano. Lado dorsal pardo claro com numerosas verrugas pontudas e faixa vertebral pouco distinta. Parotidas da fórma e do tamanho de caroços de amendoas. Ilhargas e lado interno das coxas adornados com manchas côr de enxofre palida. As manchas nas coxas são mais irregulares e em parte têm a fórma de riscos; lado ventral claro; primeiro dedo mais comprido que o segundo, ambos com escovas de copulação pretas. Terceiro e quarto unidos por membrana na base; nos pés ha uma membrana interdigital basal. Tuberculos metacarpais e metatarsais distintos, os interiores mais compridos e menos obtusos; margens

maxilares de cima alargados e salientes, principalmente na porção posterior.

Os exemplares pequenos e menos bem conservados mostram tambem vestigios de coloração decorativa.

A fórma de Hensel do Rio Grande do Sul mostra caracteres de *ornatus* Spix e *melanotis* de Duméril e Bibron; aproxima-se ainda mais de *cinctus*, do qual não se pode separar seguramente. Cito aqui as fórmas deste tipo e dou uma estampa.

BUFO CRUCIFER VAR. HENSELI.

Aproveito um exemplar de São Bento, Estado de Santa Catarina, aquarelado em estado fresco em 1923. Distingue-se claramente de *stellata*; é menor e mais esbelto, com um comprimento de 7,5 mm. A cabeça, perto dos angulos da boca, tem a largura de 27 mm. e aparece bastante saliente; o dorso principalmente na parte central côr de cobre bastante carregada; a péle e quasi lisa, uma faixa branca mediana principando na região interorbital estende-se á região coccigeal. O resto do lado dorsal é cinzento claro, virando um pouco para o lilaceo; as extremidades mostram algumas faixas transversais bastante largas e afastadas entre si. Flancos claros com desenho variegado de claro e escuro Ao lado interno da coxa com duas series de manchas amareladas de gomagota, em parte falciformes com concavidade anterior. O lado ventral é granuloso, um tanto acinzentado e com manchas mais escuras, mal determinadas, na garganta, nos lados do tronco e nas pernas. Os tuberculos metatarsais e metarearpais são claramente alongadas e de côr mais clara. Trata-se provavelmente de uma femea que acabou de desovar.

Á mesma especie provavelmente pertence um macho menos bem conservado, apanhado em Gramado (Estado do Rio Gr. do Sul), em 22. I. 1931 pelo Dr. Cesar Pinto de quem o recebemos. Este mostra parotidas alongadas e estreitas, de côr mais clara. O comprimento alcança 5 cm., a largura pouco menos de dois. As extremidades são delgadas, mas os antebraços distintamente espessados. Não se vê as escovas copulatorias dos primeiros dedos. O corpo é densamente coberto de verrugas pequenas e achatadas. As faixas transversais nas pernas são visiveis embora menos acusadas. A estria vertebral difere do outro exemplar. Trata-se de um macho com testiculos alongados de côr clara.

Hensel descreveu um sapo das matas virgens de Estado do Rio Grande do Sul, que sou inclinado de pôr em relação com as fórmas acima por motivos oecologicos. É verdade que eles mostram mais amarelo, mas tendo sido apanhados em copula, talvez se trate de um colorido nupcial.

Bufo scaber Spix foi nomeado um exemplar de 66 cm. de comprimento que na estampa é de côr de argila cinzenta, que Spix no texto chama *olivaceobrunneus*, o que não concorda. Podia-se considerar como *crucifer inornatus*, se não fossem as manchas amarelas no lado interno da coxa. Faltam os caracteres de *melanotis*. Assim fórma transição de *ornatus* para o *cinctus*. Tenho um individuo semelhante do Rio de Janeiro. Em Minas esta fórma parece comun.

Bufo dorsalis é um exemplar semelhante porém menor (« *Bufo scabro et ornato affinis* »). Todos os cinco exemplares do tipo de *dorsalis* procediam da Provincia de Rio de Janeiro.

Bufo semilineatus é um exemplar novinho (1 3/4") no qual a estria dorsal se acentúa posteriormente, um caracter sem a menor importancia. O exemplar provinha do Rio Itapicurú (Baía). O nome não merece ser mantido.

BUFO ORNATUS SPIX.

Em tempos passados costumava encontrar no Rio de Janeiro sapos menores que correspondiam á descrição e figura de Spix na «Reise nach Brasilien, Vol. II, pag. 132 ». Tambem Hensel viu um exemplar parecido colhido na mesma região. Nesses individuos o dorso apresenta uma côr ocracea avermelhada, que póde tornar-se côr de tijolo ou cobre. A listra dorsal é bem acusada e bem clara; nesta se assentam manchas pretas bastante separadas que se alongam em sentido lateral, de modo a formar uma cruz quadrupla, geralmente mal definida, que causou o nome *crucifer*, estabelecido por Wied. Tais exemplares são geralmente menores, muitas vezes apenas meio crescidos. Um exemplar desta ordem foi figurado por Spix que lhe deu o nome *ornatus*, indicando como procedencia a Provincia Rio de Janeiro. A côr dorsal desse Batraquio é, comtudo bastante mais clara do que se costuma observar. Em meu material da Baía havia um exemplar de 5 1/2 cm. de comprimento que mostrava claramente o desenho dorsal caracteristico de *Bufo ornatus*, em combinação com as manchas amarelas que são indicadas como caracteristicos de *B. cinctus*. A faixa preta nos lados era presente, mas muita estreita. O timpano pardo cinzento é limitado adiante por uma mancha semilunar de côr preta. A côr vermelha de cobre no dorso tornou-se cinzento sujo pela conservação em alcool. Tratava-se de um individuo novo antes da maturidade sexual.

Uma coloração que corresponde ao *B. ornatus* não se encontra em individuos grandes e por isso pode ser considerado como coloração de animais novos. Manchas dorsais pretas podem algumas vezes ser achadas em exemplares maiores, mas geralmente distantes da estria mediana

e lembrando mais as manchas pretas, observadas, ás vezes, em outros especies de Bufo.

O resultado de todos as minhas investigações é, que se póde distinguir certas fórmas, mas que elas mostram transições e que existem muitos tipos de mixtura.

Miranda-Ribeiro dá uma estampa de um tipo que chamou de *var. pfrimeri* sem mencionar a procedencia. Distingue-se pelo lado dorsal escuro e a extensa pigmentação do lado ventral, que mostra apenas manchas brancas redondas e separadas. Póde ser considerado como variação altamente melanistica. Nos meus numerosos exemplares não existe nenhum bem parecido, porém alguns mostram um degrau inferior de melanismo, que se caracterisa no lado ventral por vermiculações enegrecidas.

A forma figurada com o nome *B. crucifer var. roseana* (tambem sem a procedencia) como já acima observei, não é seguramente distinta do *B. rufus*. Se não pertencer a este, trata-se de uma variação pouco espalhada e antes individual.

BUFO TYPHONIUS Schneider (L. 1785) (= **margaritifer** Laurenti 1788)

Esta especie, conhecida de muito tempo, foi descrita repetidas vezes, é mais minuciosamente por Duméril e Bibron debaixo do nome de Laurenti, referindo-se aos exemplares de Cayenne e do Brasil. Comtudo não se obtem uma idéa bem clara deste sapo, porque a maioria dos caracteres citados não são constantes ou não são especificos. A especie evidentemente é muito variavel e difere nos varios estados de idade. As primeiras descrições dos exemplares brasileiros foram dados por Spix, mas são quasi sem valor, como tambem as gravuras que acompanham. Estas representam exemplares novos com 3 ou 4 nomes diferentes.

Esta especie ocorre em todo o Norte da America do Sul, incluindo o Ecuador. Na Amazonia parece pouco rara, porém o meu material se limita a cinco individuos conservados regularmente bem, embora bastante antigos, da Guiana inglesa e de Barro Colorado (Zona do canal de Panamá). Mostram a fórma especial da maxila superior, mas as verrugas conicas do dorso anterior que ocasionaram o nome «margaritifer» faltam completamente; tambem a cabeça não é muito pontuda. O alargamento da maxila superior e a sua saliencia lateral é bem evidente e aparece mesmo nos exemplares novos de Barro Colorado, nos quais as cristas cefalicas não são ainda bem marcadas. Tambem a frouxidade da péle do corpo posterior, relevada por Duméril e Bibron, não é bem clara; apenas as regiões laterais do tronco e das coxas são ligadas por uma

dobra cutanea laxa. A estria dorsal, de côr clara, bem frequente em varios outras especies, é pouco visivel nos meus exemplares.

Boulenger dá um desenho do lado superior da cabeça e Baumann outros de *typhonius* em diferentes idades. De outras gravuras representando o animal inteiro, conheco apenas aquelas de Spix e de Miranda-Ribeiro. O primeiro autor acompanha os seus desenhos de 3 ou 4 exemplares novos com descrições curtas e que não teem valor para o conhecimento da especie. De outro lado Miranda-Ribeiro dá desenhos em côres bastante vivas que representam um macho adulto, talvez em fase nupcial. O desenho do lado dorsal é bom, a vista lateral parece menos natural, mas mostra bem as verrugas margaritadas que aparecem em perfil. Seu exemplar foi colhido em Aripuanan.

No desenho de Miranda-Ribeiro reconhece-se imediatamente manchas dorsais, que tambem são frequentes em outras especies, e além disso quatro manchas brancas; o fundo do dorso parece avermelhado. Com tudo estes caracteres não são constantes e os exemplares conservados teem uma côr suja, amarela ou pardacenta, correspondendo a varias qualidades de terra; póde ser considerado protetiva. No dorso das extremidades póde haver faixas transversais, mais ou menos distintas. O lado ventral é sempre mais claro e finamente granulado, branco-amarelado ou acinzentado com pontilhado escuro pouco acentuado. Em geral póde-se dizer que o colorido e o desenho do *B. typhonius* correspondem aos varios tipos de *B. crucifer* ao qual tambem se assemelha em outros caracteres. A formação singular da maxila superior, já um pouco indicada em *B. crucifer*, ainda permanece o caracter mais seguro e constante. A crista parietal não é sempre tão clara como é representada no desenho do Boulenger e póde haver uma indicação da mesma em *crucifer*. Quanto ao tamanho, ha poucos dados. Os exemplares mencionados alcançavam um comprimento de 6 cm ou pouco mais, mas o desenho de Boulenger permite concluir a um exemplar bastante maior.

Para esta especie Cuvier indicou o nome generico *Otilophus*, ignorado com razão pela maioria dos autores. Outros nomes genericos que se referem aos desenhos de Spix, permanecem esquecidos.

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS XIII — XXVII.

ESTAMPA XIII

Em cima das esquerda para a direita: *Bufo marinus*, dois machos e duas femeas de Pindamonhangaba. Tamanho 1/3.

Em baixo da esquerda para a direita: *Bufo paracnemis*, macho e femea, de Pennapolis, Estado de São Paulo. Tamanho 1/3.

ESTAMPA XIV

Aspecto ventral dos mesmos; tamanho 1/3.

ESTAMPA XV

Bufo paracnemis, macho, aspecto dorsal.

ESTAMPA XVI

Bufo paracnemis, macho, aspecto ventral, prov. Nova Europa, comprimento 9 cm.; nota-se escovas nupciais nos primeiros dedos.

ESTAMPA XVII

Bufo paracnemis, de Olinda, (Pernambuco), femea adulta com manchas dorsais grandes, 2/3 do tamanho natural.

ESTAMPA XVIII

Bufo paracnemis, de Pirajá (Baía), com vermiculações largas na face inferior. Femea adulta em 1/2 de tamanho natural.

ESTAMPA XIX

Bufo marinus, em cima: macho no centro, duas femeas, uma de cada lado. Em baixo: aspecto ventral, procedencia Novo-Friburgo, formas melanisticas. Tamanho 1/3.

ESTAMPA XX

Bufo arenarius, em cima da esquerda para a direita, femea e macho, com desenho semelhante ao da femea; em baixo femea com manchas e macho sem manchas. Tamanho 1/3.

ESTAMPA XXI

Em cima: *Bufo rufus* Garman, (*rubescens* Lutz). Macho do Estado de Minas Gerais, 3/4 de tamanho natural. Em baixo: *Bufo d'Orbignyi* femea, proc. S. Francisco de Paula, Rio Grande do Sul. Desenhos de P. Sandig (1) e A. Pugas (2).

ESTAMPA XXII

Fig. 1 *Bufo crucifer*, femea, Rio de Janeiro, tamanho natural.
Fig. 2 *Bufo crucifer*, var. *stellata*, macho de Caruarú, Pernambuco, comprimento 3/4 do natural.

ESTAMPA XXIII

Bufo crucifer, *var.* Henseli ♂, proc. São Bento, E. de Santa Catarina, tamanho natural. A parte central do dorso côr de cobre. Desenhos de P. Sandig.

ESTAMPA XXIV

Fig. 1 *Bufo crucifer*, de Baía, com os caracteres de *cinctus* Wied e aproximações ao *ornatus* Spix (Tam. natural).

Fig. 2 *Bufo crucifer* Wied de Baía, exemplar novo, correspondendo ao *ornatus* Spix, mas com as manchas amarelos de *cinctus* Wied. Tamanho natural.

ESTAMPA XXV

Bufo globulosus, macho de Maracay (Venezuela). Tamanho natural. Em cima: face dorsal, em baixo: face ventral.

ESTAMPA XXVI — *Cristas da cabeça* (T. nat.).

Fig. 1 *Bufo paracnemis*, femea de Pindamonhangaba (São Paulo).

Fig. 2 *Bufo marinus*, femea de Novo Friburgo, (Estado do Rio de Janeiro).

Fig. 3 *Bufo arenarius*, femea de Buenos Aires. Tudo em tamanho natural. Desenhos de A. Pugas.

ESTAMPA XXVII — *Cristas da Cabeça* (T. nat.).

Fig. 1 *Bufo d'Orbignyi*, femea de São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul .

Fig. 1a *Bufo d'Orbignyi*, macho de Buenos Aires.

Fig. 2 *Bufo crucifer*, var. Henseli, femea de Gramado, Rio Grande do Sul.

Fig. 3 *Bufo crucifer*, Rio de Janeiro.

Fig. 4 *Bufo rufus*, Estado Minas Gerais.

Fig. 5 *Bufo crucifer*, var. *stellata* de Spix, Caruarú, Estado de Pernambuco.

Fig. 6 *Bufo globulosus* Spix, Natal, Rio Grande do Norte.

Fig. 7 *Bufo typhonius*, Kataarbo, Brit. Guyana.

Fig. 8 *Cabeça de um Bufo com cristas osseas salientes*: c, crista canthal, ot, crista orbitotympanal, p. crista parietal, pro, crista praeorbital, pto. crista postorbital, spo. crista supraorbital. Copia de um desenho meio esquematico de Nieden.

Foto de J. PINTO

Dr. Adolpho Lutz: Notas sobre especies brasileiras do genero *Bufo*.
Zur Kenntnis der Brasilianischen Kroeten vom Genus *Bufo*.

Foto de J. PINTO

Dr. Adolpho Lutz : Notas sobre especies brasileiras do genero *Bufo*.
Zur Kenntnis der Brasilianischen Kroeten vom Genus *Bufo*.

Foto de J. PINTO

Dr. Adolpho Lutz : Notas sobre especies brasileiras do genero *Bufo*.
Zur Kenntnis der Brasilianischen Kroeten vom Genus *Bufo*.

Foto de J. PINTO

Dr. Adolpho Lutz : Notas sobre especies brasileiras do genero *Bufo*.
Zur Kenntnis der Brasilianischen Kroeten vom Genus *Bufo*.

Foto de J. PINTO

Dr. Adolpho Lutz: Notas sobre especies brasileiras do genero *Bufo*.
Zur Kenntnis der Brasilianischen Kroeten vom Genus *Bufo*.

A. PUGAS, del.

Dr. Adolpho Lutz: Notas sobre especies brasileiras do genero *Bufo*.
Zur Kenntnis der Brasilianischen Kroeten vom Genus *Bufo*.

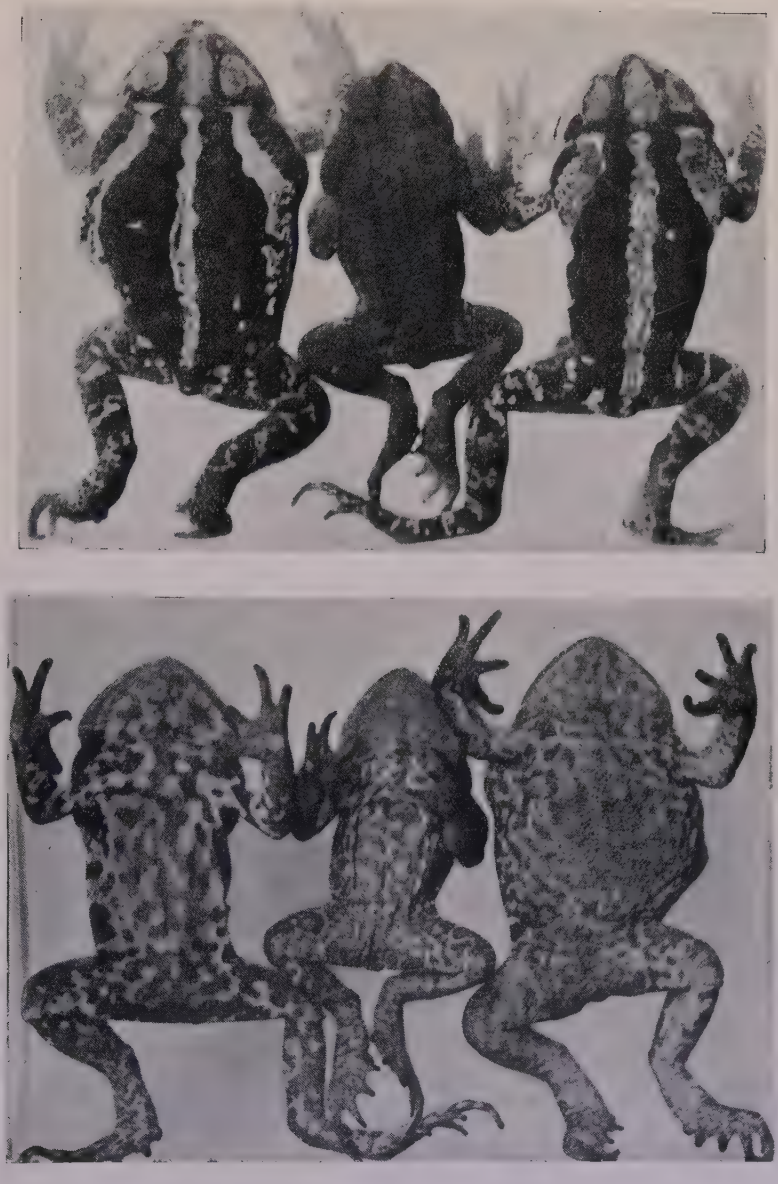


Foto de J. PINTO

Dr. Adolpho Lutz : Notas sobre especies brasileiras do genero *Bufo*.
Zur Kenntnis der Brasilianischen Kroeten vom Genus *Bufo*.

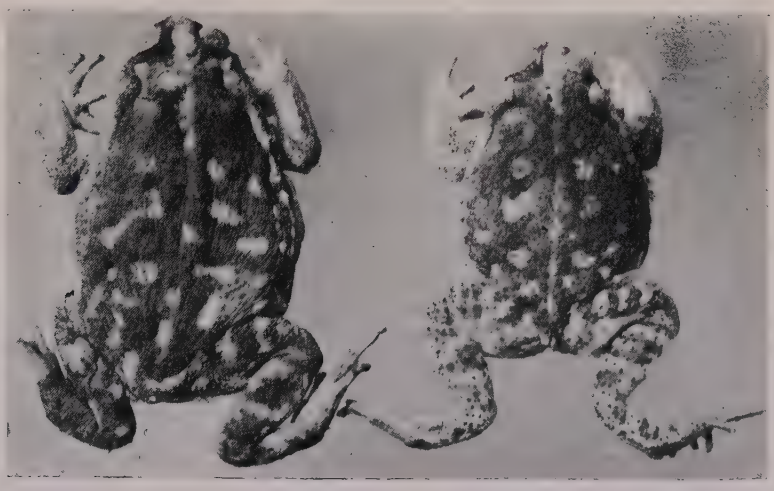


Foto de J. PINTO

Dr. Adolpho Lutz : Notas sobre especies brasileiras do genero *Bufo*.
Zur Kenntnis der Brasilianischen Kroeten vom Genus *Bufo*.

P. SANDIG e A. PUGAS, del.

Dr. Adolpho Lutz: Notas sobre especies brasileiras do genero *Bufo*.
Zur Kenntnis der Brasilianischen Kroeten vom Genus *Bufo*.

Foto de J. PINTO e R. HONORIO, del.

Dr. Adolpho Lutz : Notas sobre especies brasileiras do genero *Bufo*.
Zur Kenntnis der Brasilianischen Kroeten vom Genus *Bufo*.

P. SANDIG, del.

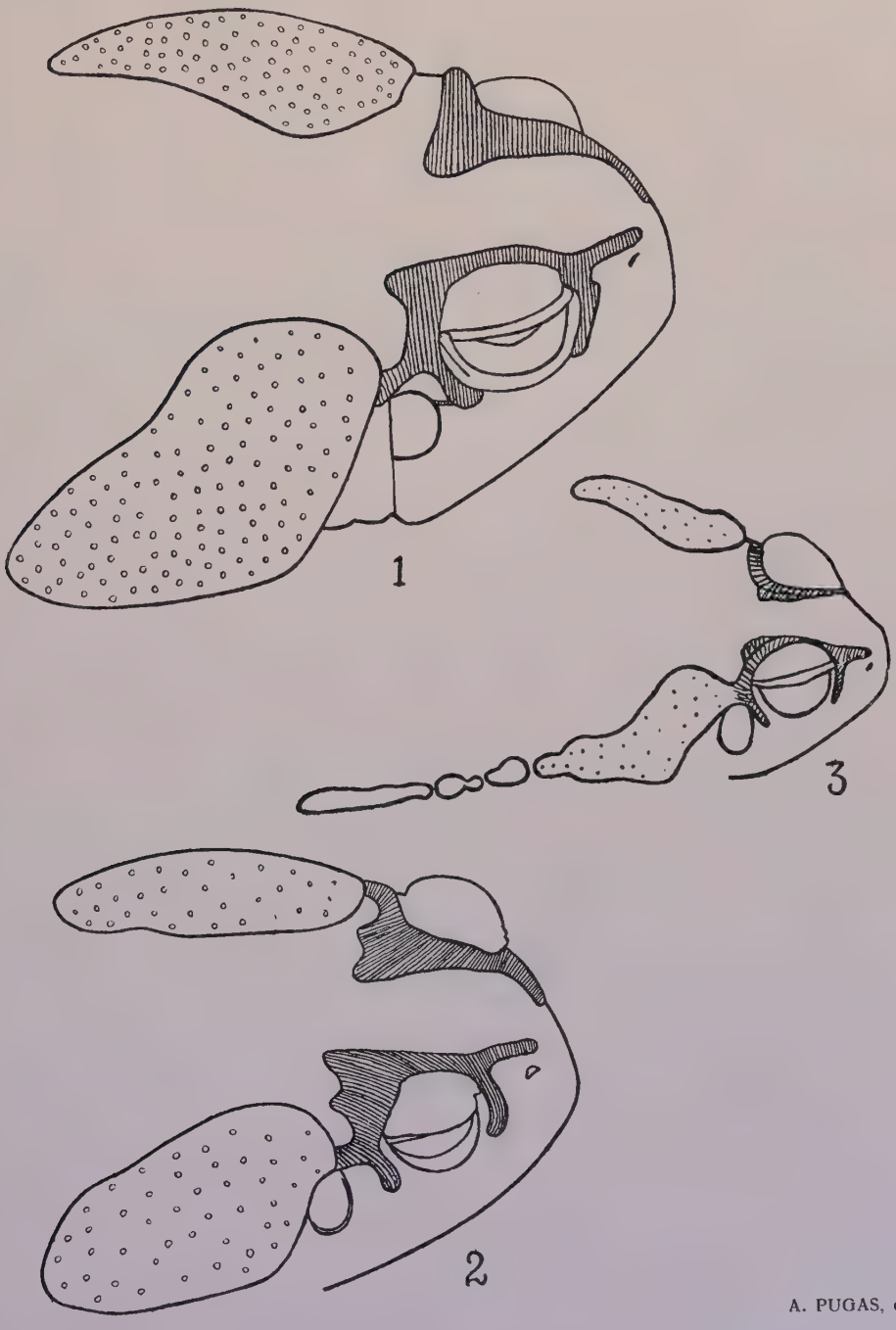
Dr. Adolpho Lutz: Notas sobre especies brasileiras do genero *Bufo*.
Zur Kenntnis der Brasilianischen Kroeten vom Genus *Bufo*.

Dr. Adolpho Lutz : Notas sobre especies brasileiras do genero *Bufo*.
Zur Kenntnis der Brasilianischen Kroeten vom Genus *Bufo*.

A. PUGAS, del.

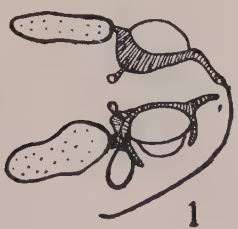
P. SANDIG, del.

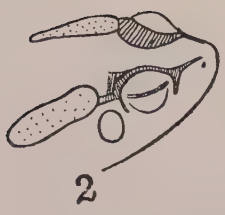
Dr. Adolpho Lutz : Notas sobre especies brasileiras do genero *Bufo*.
Zur Kenntnis der Brasilianischen Kroeten vom Genus *Bufo*.

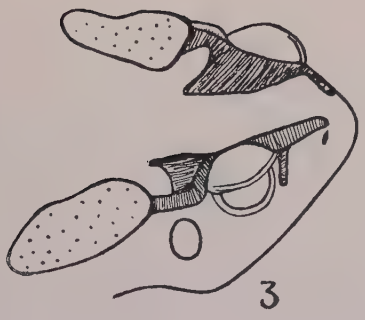


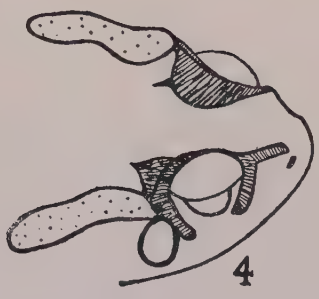
A. PUGAS, del.

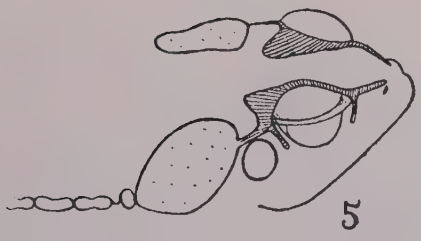
Dr. Adolpho Lutz: Notas sobre especies brasileiras do genero *Bufo*.
Zur Kenntnis der Brasilianischen Kroeten vom Genus *Bufo*.

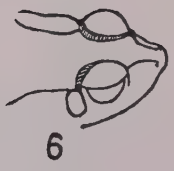


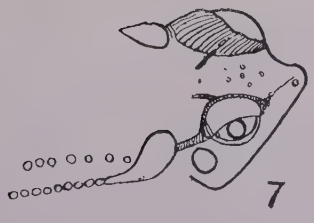


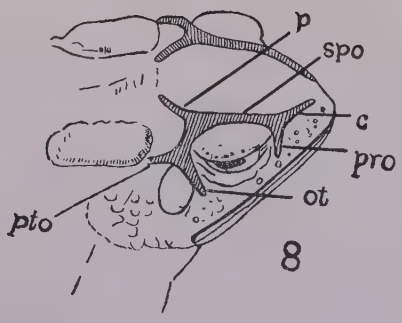












A. PUGAS, del.

Dr. Adolpho Lutz: Notas sobre especies brasileiras do genero *Bufo*.
Zur Kenntnis der Brasilianischen Kroeten vom Genus *Bufo*.

Zur Kenntnis der Brasilianischen Kroeten vom Genus Bufo

von

DR. ADOLPHO LUTZ

(Mit Tafeln XIII — XXVII)

Die echten Kroeten von Genus Bufo sind fast kosmopolitisch und in Brasilien durch acht oder mehr Arten vertreten. Diese sind schon beschrieben und enthalten einige der groessten Arten. Sie werden leicht erkannt an der rauhen und trockenen, mit Warzen besetzten Haut und den kurzen Beinen, welche keine grossen Spruenge gestatten, ferner durch den Aufenthalt am Lande und die wenig lebhaften Farben. Weitere sichere Kennzeichen sind der vollstaendige Mangel an Zaehnen, die hinten in grosser Ausdehnung freie Zunge, das sichtbare Trommelfell und die Parotiden, welche fast immer leicht erkennbar und oft sehr gross sind. Die Finger und Zehen tragen keine Scheiben, erstere sind frei und letztere nur durch kurze Membranen verbunden. Viele Arten sind durch knoecherne Kaemme ausgezeichnet, welche auf der Oberseite des Kopfes sitzen und zur Unterscheidung der einzelnen Arten beitragen.

Im Gegensatz zu den Froeschen fuehlen sich die Kroeten meist trocken an. Die Schleimdruesen treten bei ihnen gegen die Druesen mit granuliertem Inhalt sehr zurueck. Die Epidermis neigt zur Verhornung und gibt daher offenbar wenig Wasser ab. Es erklaert dies, warum sich die Kroeten solange lebend erhalten koennen, ohne mit Wasser in Beruehrung zu kommen. Die Finger- und Zehenspitzen sind oft mit schwarzen Hornmassen bedeckt, auch die Handteller und Fussohlen erscheinen bei manchen Arten deutlich schwarz und verhornt, ausserdem sind aber auch aeusserst zahlreiche Hornpapillen vorhanden, die sich bei beiden Geschlechtern oft als schwarze Punkte praesentieren.

Die meisten Arten neigen zu Variationen und ihre Geschlechter koennen ganz verschieden aussehen. Es kommen auch melanistische Formen vor. Ausserdem zeigen auch die einzelnen Individuen einen deutlichen Farbenwechsel; dies fuehrt zu einer Erschwerung der Bestimmung.

Die Kroeten sind durch ihre Giftdruesen, ihre versteckte Lebensweise und durch ihre Faerbung in hohem Grade geschuetzt. Die Ober-

seite erinnert in ihrer Farbe an Sand, Lehm oder Erde. Allerdings treten besonders bei den Weibchen oft helle Flecke auf, welche in die Augen fallen koennen. Die weit verbreiteten dunklen Flecken sind weit weniger bemerkbar und die seltenen Schmuckfaerbungen sind, wie bei anderen Batrachiern, so lokalisiert, dass sie beim Sitzen verdeckt werden. Dass die Schutzvorrichtungen nicht immer ausreichen, beweist ein 13 cm. langes, sehr dunkles Maennchen von *Bufo marinus*, welches im Magen einer Schlange (*Xenodon Merremii*) gefunden wurde.

Die brasilianischen Arten sind meist schon wiederholt und mehr oder weniger genau beschrieben worden, doch fehlen Angaben, besonders ueber die Charaktere, welche dieselben am besten von einander unterscheiden. Diese werde ich anfuehren und ausserdem zwei weniger bekannte Arten besprechen. Es ist auch angebracht, die Unterschiede der beiden Geschlechter in der Farbe und Zeichnung anzufuehren. Ich beziehe mich nur auf die vollstaendig erwachsenen Individuen, die haeufig an der Innenseite der ersten Finger Kopulationsbuersten zeigen, die ebenso schwarz sind, wie die Spitzen der sehr zahlreichen Hornpapillen. Kennt man die erwachsenen Arten, die an denselben Orten vorkommen, so gelingt es leicht, auch kleinere Individuen zu bestimmen, wenn es sich nicht um die ersten Jugendstadien handelt.

Bei Kroeten, wie auch bei anderen Batrachiern, kommen gelegentlich Exemplare vor, welche das Mass der geschlechtsreifen Tiere weit ueberschreiten. Es beweist dies, dass bei den betreffenden Tieren das Wachstum nicht mit der Geschlechtsreife aufhoert und auch die Lebensdauer das gewoehnliche Mass weit ueberschreiten kann.

Der Genusname *Bufo* umfasst alle einheimischen Kroeten. Fuer einzelne Arten sind andere Gattungsbezeichnungen aufgestellt worden; doch sind dieselben nicht hinreichend begruendet und daher auch nicht durchgedrungen.

LITERATUR

Es erscheint ueberfluessig, alle Publikationen aufzuzaehlen, welche brasilianische Kroeten anfuehren. Ich beschraenke mich auf die wichtigste Literatur seit Beginn des vorigen Jahrhunderts, in welchem auch die frueheren, schwer zu beschaffenden Quellen zitiert sind.

Von den Autoren, die in Brasilien gesammelt haben, kommt in erster Linie Prinz von Wied in Betracht (Bibliographie, Nr. 1 und 2). Seine Angaben finden sich in den Sammelwerken referiert. Das grosse Werk von Spix enthaelt farbige Abbildungen und kurze lateinische Beschreibungen aller von ihm beobachteten angeblichen Arten, die aber in

Wirklichkeit oft verschiedene Geschlechter und Alterszustaende darstellen. Die Zeichnungen sind leidlich ausgefuehrt, soweit der Zustand des Materials es erlaubte, dagegen sind die Farben nach Qualitaet und Umrissen im hoechsten Grade unzuverlaessig. Die Angabe der Lokalitaet ist von grosser Wichtigkeit, um noch nachtraeglich die Bestimmungen der Arten zu erleichtern. Das Originalmaterial von Spix wurde von Peters nach fast sechzig Jahren untersucht, bestimmt und besprochen, was den Wert des Spix'schen Werkes bedeutend erhoeht. Natuerlich muss das Material, obwohl gut konserviert, noch seitdem gelitten haben, selbst wenn es nicht vor der Darstellung von Spix oefters sehr veraendert war, was hoechst wahrscheinlich ist. Die Bestimmungen von Peters duerften im allgemeinen der gegenwartigen Orientierung entsprechen. Immerhin koennen einige kleine Zweifel bestehen, soweit es sich um damals nicht genuegend bekannte Arten gehandelt hat.

Was bei den Spix'schen Abbildungen sehr auffaellt, ist, dass einige derselben eine ganz unerwartete Groesse zeigen, wie sie jedenfalls nur ganz ausnahmsweise beobachtet wird. Es gilt dies z. B. von *B. agua*, *Phyllomedusa bicolor* und *B. stellatus*, auch *Rana gigas* (gleich *Leptodactylus ocellatus*), muss ein Riesenexemplar gewesen sein, da weder der Autor, noch Peters angibt, dass die Zeichnungen die dargestellten Tiere an Groesse uebertreffen.

Von Sammelwerken habe ich namentlich folgende hervorzuheben: Duméril und Bibron, Guenther, Boulenger und Nieden. Mit einzelnen brasilianischen Kroeten haben sich viele Autoren beschaeftigt, deren Publikationen ich im chronologischen Zusammenhange auffuehre. Diejenigen, die ausfuehrliche Literaturverzeichnisse geben, sind mit einem Sternchen bezeichnet. Auf eigene Beobachtungen an lebenden Tieren gestuetzt, sind namentlich die Mitteilungen von Hensel, Berg und Kati Fernandez, auch Lutz, Miranda-Ribeiro und Lorenz Mueller haben teilweise lebende Exemplare benutzt. Die uebrigen Autoren stuetzen sich auf konserviertes Material.

LITERATUR

1820 WIED, MAXIMILIAN — Reise nach Brasilien (1815-17).

1825-33 WIED, MAXIMILIAN — Beiträge zur Naturgeschichte von Brasilien.

1824 SPIX, J. B. — Animalia nova sive Species novae Testudinum et Ranarum, quas in Itinere per Brasiliam Annis 1817-20 . . . . .

1834-54 DUMÉRIL e BIBRON — Erpét. générale ou Histoire naturelle complète des Reptiles, Tome 9 et Atlas. — Paris.

* 1858 GUENTHER, ALBERT — Cat. of the Batrachia salienta in the collection of the British Museum, London.

1861 REINHARDT, J, & LUETKEN, CH. — Bidrag til kundskab om Brasiliens Pader og Krybdyr in: Vidensk. Meddel, naturh. For., Kjöbenhavn.

1867 HENSEL, DR. REINH. — Archiv für Naturgeschichte, Bd. I., Berlin.

1873 PETERS — Ueber die von Spix in Brasilien gesammelten Batrachier, Berlin, Monatsber. der Koenigl. Preuss-Akad. d. Wiss. 1872.

* 1882 BOULENGER, G. A. — Cat. of the Batrachia salientia in the Collection of the British Museum, 2. Edition by George Albert Boulenger, London.

* 1896 BERG, CARLOS — Batrachios Argentinos in: An. Mus. Buenos Aires, Vol. 5, Juan & Alsino, Buenos Aires.

1917 WANDOLLEK, DR. B. — Einige neue und weniger bekannte Batrachier von Brasilien (Leipzig).

1912 BAUMANN, DR. F. — Brasilianische Batrachier des Berner Naturhistorischen Museums. Zool. Jahrb. Abt. f. Systematik, Jena.

1927 MUELLER, LORENZ — Amph. u. Rept. d. Ausb. Prof. Bresslau's in Brasilien 1913-14. Sonderabdr. aus den Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Ges., Bd. 40, Heft 3.

1923 NIEDEN, Dr. Fr. — ANURA I, Das Tierreich, Bd. N.° 46.

1926 LUTZ, DR. ADOLPHO — New species of Brazilian Batrachians. Preliminary note. Trabalhos do Instituto Oswaldo Cruz, Manguinhos, Rio de Janeiro).

1926 MIRANDA-RIBEIRO, ALIPIO — Notas sobre Gymnobatrachios (Anura) Rio de Janeiro.

1927 KATI FERNANDEZ — Sobre la Biologia y Reprodución de Batracios Argentinos (Segunda Parte). Del Boletin de la Academia Nacional de Ciencias en Córdoba, tomo XXIX, pags. 271-328.

LUTZ, DR. ADOLPHO — Notas sobre Batrachios da Venezuela e da Ilha de Trinidad, Tomo XX-Fasc. (Gefolgt vom englischen Text, beide Texte auch separat).

BUFO MARINUS, PARACNEMIS UND ARENARIUS.

Die drei grossen Arten, die ich zuerst bespreche, sind *Bufo paracnemis* Lutz, *Bufo marinus* Schneider und *Bufo arenarius* Hensel. Sie

sind gelegentlich verwechselt worden, lassen sich aber leicht trennen. *B. arenarius* hat sehr lange und schmale Parotiden, die sich am Ende in einzelne Teile von laengerer oder runder Form aufloesen. Es genuegt, um sie von dem aehnlichen *B. marinus* zu unterscheiden. Ausserdem sind die Knochenkaemme des Kopfes bei *arenarius* etwas verschieden.

B. paracnemis und *B. marinus* haben beide grosse und vorspringende Parotiden, die namentlich in ihren vorderen Teilen stark verbreitet sind; ausserdem zeigen dieselben sehr deutliche Poren. Bei *B. paracnemis* kommt noch ein Druesenkomplex an der inneren Seite des Unterschenkels vor, der aus zwei Laengsreihen von runden Einzeldruesen besteht, die leicht zu fuehlen sind. Diese enthalten gleiches talgartiges Sekret von derselben Giftigkeit wie das der Parotis; es kann leicht durch Druck entleert werden. Die Haut ueber den Druesen ist gewoehnlich durch eine gleichfoermige dunkle Farbe unterschieden.

Die *glandula paracnemis* steht meines Wissens unter den Batrachiern einzig da. Nur beim europaeischen *Bufo calamita* finden sich Druesenkomplexe an den Extremitaeten. Hier sind sie indessen auch auf den Vorderarmen lokalisiert.

BEOBACHTUNGEN UEBER KROETEN, DIE UNTER DEM NAMEN *B. MARINUS* (SCHNEIDER) KLASSIFIZIERT WURDEN.

Die Literatur ueber die unter dem Namen *B. marinus*, *B. agua*, *B. ictericus* und anderen Bezeichnungen angefuehrten Kroeten, begann schon vor beinahe zwei Jahrhunderten; sie ist heute sehr ausgedehnt und ihr Studium ist ebenso schwer durchzufuehren, wie die Untersuchung der Typen, welche der Beschreibung zugrunde lagen. Es ist wenig wahrscheinlich, dass diese Arbeit ein entsprechendes Resultat geben wuerde.

In der neueren Literatur stimmen die Autoren darin ueberein, die Typen von Suedamerika (ausschliesslich von Patagonien und den transandinischen Laendern), ausserdem von Zentralamerika und auch von den Antillen, unter demselben Namen aufzufuehren. Schon in der Érpétologie von Duméril und Bibron wurde versucht, eine Einteilung auf Grund der wechselnden Form der Parotiden zu begruenden, die Autoren kamen aber zu dem Schluss, dass im gegebenen Falle dieselbe keinen spezifischen Wert zeigte; indessen hat den Autoren unzweifelhaft mehr als eine Art vorgelegen. In der Biologia Centrali-americana gibt Guenther an, dass die Exemplare von Zentralamerika nicht die enorme Groesse erreichen, die fuer andere Exemplare, z. B. aus Guiana, angegeben wird.

Vor mehr als vierzig Jahren war in den niedrigst gelegenen Teilen

der Stadt São Paulo eine Art, die meist als *B. agua* oder *B. marinus* bestimmt wurde, so gewoehnlich, dass beim Eintreten der Dunkelheit dieselbe in groesserer Zahl unter den Gaslaternen gesammelt werden konnte. Sie wartete daselbst auf die Kaefer, welche dem Licht zuflogen.

Waehrend ich in São Paulo *Cystodiscus immersus*, den ich in der Gallenblase entdeckte, und andere Parasiten, wie *Echinorhynchus Lutzii* von Linstow studierte, habe ich wohl gegen hundert dieser Kroeten beobachtet, sodass ihr Typus mir vollstaendig gelaeufig war. Er kann sich auch in den letzten Jahren nicht veraendert haben, doch sind infolge von Drainierung und Terrainveraenderungen die Kroeten selbst sehr selten geworden. Ich habe indessen denselben Typus an anderen nahe gelegenen Orten, z. B. Pindamonhangaba, beobachtet, wo sie ebenfalls in groesserer Zahl unter den oeffentlichen Laternen erschienen. Dieselbe Form wurde im Staate Rio Grande do Sul von Hensel bemerkt, der den sexuellen Dichroismus hervorhob, der von Duméril und Bibron zwar angefuehrt, aber nicht in seiner Natur erkannt wurde. Der Typus herrscht suedlich von Rio vor, findet sich aber auch mehr im Norden.

Im Jahre 1911 fing ich ein typisches Weibchen in Independencia, Staat Parahyba, zusammen mit *Leptodactylus vastus* Lutz. Eine Anzahl von Kroeten, die ich in Trinidad zu untersuchen Gelegenheit hatte, unterschied sich durchaus nicht von den typischen *marinus* des suedlichen Brasiliens. Im Gegensatz zu *B. crucifer* fand ich *B. marinus* nie in den Gaerten der Hauptstadt. Die Art erscheint aber schon in einer Entfernung von wenig Meilen z. B. in Bangú.

Lorenz Mueller beschrieb eine groessere Anzahl von *Bufo marinus*, die von Bresslau an verschiedenen Plaetzen gesammelt wurde; sie sind jedoch alle jung oder halbwuechsig. Was er als *Bufo marinus marinus* bezeichnet, scheint mir nicht genuegend definiert. Ich ziehe es vor, die Form, die suedlich vom Wendekreis des Steinbocks vorherrscht, als *Hensel'sche Form* zu bezeichnen. Ihre Laenge ueberschreitet selten 12-13 cm.

In den letzten sechs Jahren erhielt ich durch die Freundlichkeit von Dr. Octavio Magalhães, Direktor des Instituts *Ezequiel Dias* in Bello Horizonte, eine groessere Anzahl von Kroeten, die aus dem Staate Minas Geraes stammten. Sie gehoerten saemtlich zu zwei verschiedenen, anscheinend neuen Arten, von denen ich 1926 unter dem Namen *Bufo paracnemis* und Bufo *rubescens* eine vorlaeufige Beschreibung gab. Man konstatiert eine voellige Abwesenheit der Hensel'schen Form, die gewoehnlich reichlich auftritt, wo sie ueberhaupt vorkommt. *B. paracnemis* ist viel groesser und die Laenge der groessten Exemplare betraegt gewoehnlich 18-19 cm. gegen 12-13 cm. bei *Bufo marinus*. Die dunklen und

gewoehnlich zahlreichen Flecke der Weibchen waren schwarz und nicht braun, so dass die ganze Rueckenseite mehr gleichfoermig erscheint.

Die Maennchen, deren Zeichnungen denen der Weibchen gleichen, erreichen gewoehnlich nur wenig mehr als zwei Drittel ihrer Groesse. Beide Geschlechter zeigen an der inneren Dorsolateralflaeche der Tibia einen laengs gerichteten, zusammengesetzten Druesenkoerper, den ich *Paracnemis* nenne, entsprechend der *Glandula parotis*. (Die Bezeichnung Parotoid ist ein Soloecismos, der schon fruehzeitig von einem mir nicht sicher bekannten Autor eingefuehrt und von anderen kopiert wurde, aber nicht beibehalten werden darf). Die Paracnemiden, die schon bei jungen Exemplaren, wenn auch weniger entwickelt vorkommen, sind fuer die Art charakteristisch. Die Parotiden variieren etwas in Groesse und Form und sind gewoehnlich verhaeltnismaessig kleiner als bei *B. marinus*; bei beiden sind sie in auffaellig breiter Eiform und schraeg gerichtet, bei *paracnemis* etwas mehr.

Im Jahre 1928 konstatierte ich zu meiner Verwunderung in Natal (Hauptstadt von Rio Grande do Norte), das Vorkommen des typischen *Bufo paracnemis*. Neuerdings sagte mir Dr. Afranio do Amaral, dass er aus dem Nordwesten von São Paulo Kroeten erhalten haette, die meiner Beschreibung von *Bufo paracnemis* entsprachen. Er hatte die Guete, mir im Oktober und November 1932 ein reichliches Material von lebenden Kroeten zu uebersenden, die von vielen Plaetzen im Nordwesten von São Paulo stammten, und zugleich einige von Minas und dem Westen von Matto Grosso. Muendliche Mitteilungen liessen mich erwarten, dass diese Art sich auch auf den Chaco erstreckt, was durch ein Exemplar bestaetigt wird, das Berg aus dem Chaco zitiert. Dieses hatte die enorme Laenge von 19 cm., was auch fuer ein Weibchen von *B. paracnemis* einen Grenzwert darstellte. (Berg hielt das Exemplar fuer ein Maennchen von *marinus*, wahrscheinlich wegen der Faerbung und Zeichnung; es muss indessen ein Irrtum sein, denn *B. marinus* erreicht niemals diese Groesse). In letzter Zeit erhielt ich von Professor Salvador Mazza verschiedene typische *B. paracnemis* aus der Gegend von Jujuy im Norden von Argentinien. Ich bat nun Prof. Barbour vom Museum of Comparative Zoology in Cambridge bei Boston um Auskunft ueber die daselbst vorhandenen Exemplare von *B. paracnemis*. Er erkannte, dass dort die beiden Spezies existierten. Der Bericht von Benjamin B. Leavitt fuehrt aus dem Museum von Boston Exemplare von *B. paracnemis* an, die die folgenden Etiketten tragen:

Ceará, Brasil;
Rio Poty, Brasil (Rio Grande do Norte);

São Gonçalo, Brasil (Rio Grande do Norte);
Januaria, Brasil (Minas Gerais);
Minas Gerais, Brasil.

Ganz neuerdings erhielt ich von Dom Pedro Pickel lebendes Material aus dem Staate Pernambuco, naemlich ein ausgewachsenes Weibchen von 700 Gramm Gewicht bei 17 cm. Laenge aus Olinda und einige halbwuechsige Exemplare aus Tapéra. Alle gehoeren zweifellos zu *B. paracnemis*.

Alles fuehrt uns zu der Ansicht, dass *B. paracnemis* eine transversale Zone bewohnt, welche sich von Ceará, Natal, und Pernambuco ueber den Norden von Bahia, Minas Gerais und den Nordwesten von São Paulo bis zum Chaco und der Provinz Jujuy erstreckt.

Es fehlen Angaben ueber das Vorkommen von *paracnemis* mehr im Norden von Suedamerika und ebenso von Zentralamerika und den Antillen. Nur von Guiana wurden Exemplare angefuehrt, die nach ihrer Groesse eher zu *paracnemis*, als zu *marinus* gehoeren.

Die von Spix gegebene Figur von *B. agua* vom Rio Negro, welche eine aussergewoehnliche Laenge von 23 cm. erreicht, kann sich ebenso gut auf *B. paracnemis* beziehen, ebenso die von Baumann zitierten grossen Exemplare, die von Pará kamen.

Die erwachsenen Maennchen koennen von den Weibchen durch verschiedene Charaktere unterschieden werden; erstens durch die ziemlich grosse Schallblase, wie man durch Kitzeln des Bauches zeigen kann, was bei den bruenstigen Maennchen ein tiefes Tremolo hervorruft. Die Kehlgegend ist meist dicht schwarz punktiert, sodass sie schwarz erscheint. Die druesigen Warzen und auch ihre Zwischenraeume sind wenigstens in der Brunstzeit mit schwarzen Hornspitzen auf der ganzen Ventralseite (mit Einschluss der Extremitaeten) besetzt, sodass sie dem Gefuehl sehr rauh erscheinen. Die schwarzen Flecke des Rueckens sind kleiner und schwaecher, aber die schwarze Vermiculation der Bauchseite ist mehr ausgesprochen. Fast alle Maennchen sind ebenso marmoriert wie die Weibchen, nur von Santo Anastasio erhielt ich zwei Maennchen von mehr gleichfoermiger olivenbrauner Farbe, wie sie bei *Bufo marinus* die Regel ist. Sie unterschieden sich jedoch durch die deutliche *Paracnemis* und waren von typischen Weibchen begleitet. Beide waren nicht in der Brunstperiode und eines der Tiere war noch nicht ganz erwachsen. Das groessere Maennchen hatte im Leben eine Laenge von 14 cm. Die Paracnemis war sehr gross.

Ausser der Groesse existieren noch andere Unterschiede zwischen *Bufo paracnemis* und *marinus* aus dem Sueden. Ersterer ist breiter und

die Parotiden sind schraeger und divergieren mehr mit der Laengsachse des Koerpers. Die Farbe der dunklen und hellen Flecke ist bei *paracnemis* mehr ausgesprochen und ihr Durchmesser ist geringer als der der Schenkeldruesen. Die Zahl der dunklen Flecke ist gewoehnlich groesser als bei *B. marinus* und ihre Groesse entsprechend geringer. Der Supra-Orbitalkamm bildet bei beiden keinen ausgesprochenen Winkel.

Die Paracnemis ist bei ausgewachsenen Tieren gewoehnlich ganz leicht zu konstatieren, weil die Druesen gefuellt sind und auf Druck ihr Sekret herauspressen lassen. Es ist vollstaendig dem der Parotis gleich. Bei juengeren Tieren ist die Paracnemis weniger deutlich, jedoch gelingt es auch dann gewoehnlich, das Sekret nachzuweisen: Bei den anderen Kroeten kann die Haut an der Stelle etwas verdickt erscheinen, es laesst sich aber kein Sekret entleeren.

Anfang Oktober erhielt ich durch Dr. Nelson Davis eine Kroete von Pirajá (Bahia), deren Laenge 162 mm. betrug bei einem Gewicht von 350 Gramm. Die Paracnemis ist gut entwickelt, der Ruecken war zuerst fast gleichfoermig schwarz, spaeter zeigte er ziemlich breite schwarze Flecke auf einem hellen Grunde (schmutzig weissgelb oder leicht gruenlich). Die ganze Bauchseite des Rumpfes mit Einschluss der Extremitaeten war von breiten schwarzen Vermikulationen bedeckt, welche an Exemplare von *Leptodactylus pentadactylus* erinnern. Das Trommelfell und das dahinter gelegene Feld war schwarz. Die Parietalkaemme sind ausnahmsweise gut entwickelt und an ihrer Spitze durch eine mehr abgerundete Leiste verbunden.

Das Stueck von Bahia und ebenso das von Olinda sind weit grossfleckiger als die Exemplare von São Paulo und erinnern infolgedessen mehr an *marinus*, doch kann ueber die Bestimmung durch die gut charaktesisierte Paracnemis kein Zweifel sein.

VARIATIONEN UND GESCHLECHTSUNTERSCHIEDE VON *BUFO MARINUS*

Bei den meisten Weibchen zeigt die Oberseite grosse Flecken von braeunlicher Farbe, welche durch eine breite hellere Vertebralbinde und aehnliche transversale Binden getrennt werden, waehrend die Unterseite nur geringe dunklere Vermikulation bietet. In hoeher gelegenen Zonen wie Theresopolis, Itaipava, Neu-Freiburg und São João im Staate Santa Catharina, findet man Exemplare, die mehr oder weniger melanistisch sind. Bei diesen koennen die Flecke auf dem Ruecken ganz schwarz erscheinen und teilweise confluiren, oder sie sind kleiner und zahlreicher, so dass sie an *B. paracnemis* erinnern. Die Zeichnung des Rueckens kann

sich auf die Rumpfseiten und die ventrale Flaeche einschliesslich der Beine ausdehnen und erscheint dann als schwarze Marmorierung. Die Oberseite der hinteren Extremitaeten kann dunkle Querbinden zeigen, wie sie uebrigens auch bei mehr normalen Exemplaren auftreten.

Beide Geschlechter von *marinus* und *paracnemis* koennen von Druesenwarzen bedeckt sein, die noch dunkler sind, als der Rest der Haut. In der Brunstzeit erscheinen auch sehr zahlreiche schwarze Hornspitzen auf und zwischen den Warzen. Die Handteller und Fussohlen bedecken sich mit einer schwarzen Hornschicht und bei den Maennchen treten an den ersten Fingerseiten Kopulationsbuersten auf. Diese Verhornung ist bei *B. paracnemis* weit staerker ausgesprochen. Bei den Maennchen der beiden grossen Kroeten ist die Vermiculation der Bauchseite mehr ausgebildet und die Kehle erscheint meist deutlich geschwaerzt.

B. marinus hat eine weit ausgedehnte Verbreitung und findet sich auch in den La Platastaaten und Rio Grande do Sul. Hensel beobachtete ihn in letzterem Staate und gab eine gute Beschreibung von dem gewoehnlichen Typus. Es finden sich zwar Variationen, aber sie sind nicht so ausgesprochen, wie der Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern. Das Maennchen ist durch den Kehlsack gekennzeichnet und hat am Ruecken ein einfarbiges Kolorit von grauer oder gruenlich brauner Farbe. Bei den Weibchen finden sich auf dem Ruecken groessere dunkle Flecke, die durch hellere Zwischenraeume getrennt sind und eine ziemlich breite, mittlere Laengsbinde. Alles dies ist auf den Abbildungen zu sehen, die so eine weitere Beschreibung entbehrlich machen. Die Art ist gewoehnlich sehr haeufig und bei eintretender Dunkelheit leicht einzufangen. Die Weibchen produzieren eine enorme Anzahl von Eiern, aus welchen sehr kleine Kaulquappen entstehen, die sich sehr bald zu ausserordentlich kleinen vierbeinigen Formen entwickeln, die zu der Groesse der erwachsenen Form in auffaelligem Gegensatz stehen.

Ein wichtiger Kontrast zwischen *paracnemis* und *marinus* besteht darin, dass bei der ersteren Art die beiden Geschlechter sich nur wenig unterscheiden, waehrend sie bei *marinus* ganz verschieden sind. Bei *paracnemis* dagegen sind die Maennchen den Weibchen aehnlich gefaerbt, haben aber bedeutend kleinere Flecken.

BUFO ARENARIUS HENSEL.

Die Angaben in der Litteratur sind teilweise irrefuehrend und die Originalexemplare von Hensel waren ueberhaupt nicht viel mehr, als halbwuechsig. Die Kopfleisten unterscheiden die Art nicht und der schwarze Fleck auf der Brust fehlt allen meinen Exemplaren, die von verschiedenen Fundorten stammen. Zeichnung und Faerbung wechseln

sehr und koennen sich derjenigen von *marinus* und *paracnemis* naehern. Gluecklicherweise laesst die Untersuchung der Parotiden ueber die Zugehoerigkeit der Art keinen Zweifel zu, was um so wichtiger ist, als *marinus* und *arenarius* sich nicht deutlich durch ihre Dimensionen unterscheiden, wie ich mich an lebenden und toten Exemplaren ueberzeugt habe. Ausserdem deckt sich ihr Verbreitungsgebiet zum Teile.

B. arenarius herrscht in den La Platastaaten vor und greift auch auf den brasilianischen Staat Rio Grande do Sul ueber, wo er mit *Bufo marinus* zusammen vorkommt. Mit letzterem ist *B. arenarius* wohl gelegentlich verwechselt worden oder er wurde als eigene Varietaet aufgefasst (Duméril und Bibron, Espada). Ich besitze Exemplare aus Montevideo und Buenos Aires und einige meist junge Stuecke aus der Bergregion von Rio Grande do Sul. Sie sind etwas kleiner, als *Bufo marinus*, diesem aber ziemlich aehnlich und zeigen denselben entsprechenden Geschlechtsdichroismus. Ausserdem habe ich ein Aquarell von einem einfarbigen Maennchen aus Montevideo, das deutlich einen hellen olivengruenen Grund zeigt. Die Art ist, wo sie vorkommt, gewoehnlich sehr haeufig. *B. arenarius* ist von *marinus* leicht durch die Parotiden zu unterscheiden. Dieselben sind schmal, verlaengert und laengs gerichtet und loesen sich in der hinteren Haelfte in einzelne runde und laengliche Druesenwarzen auf; bei manchen Exemplaren sind sie durchwegs von hellerer Farbe.

In der oberen Haelfte kann die Parotis etwas erweitert sein und auch Poren zeigen; sie ist aber immer leicht von den unfoermig grossen Parotiden der anderen Art zu unterscheiden. Die Zeichnung der Weibchen ist aehnlich wie bei *marinus*, aus dunkleren und helleren Flecken zusammengesetzt, aber im ganzen weniger lebhaft. Die blasseren Partien sind oft deutlich gruenlich und nicht selten von runden Flecken gebildet. Manche Weibchen sind fast einfarbig, die Pigmentierung der Kehle ist bei den Maennchen nicht so konstant, wie bei den vorhergehenden Arten; auf anderer Seite gibt es auch Maennchen, deren Zeichnung dem weiblichen Typus folgt. Sie koennen auch leicht erkannt werden, da sie gewoehnlich schon beim Anfassen ihre charakteristischen Toene hoeren lassen, wobei der Kehlsack leicht aufgeblasen wird.

Waehrend mein fruecheres Material von Montevideo und dem Staate Rio Grande do Sul stammte, erhielt ich neuerdings von Professor Houssay in Buenos Aires tote und lebende Exemplare von da, die meine Kenntnisse dieser Art etwas erweiterten. Es fand sich darunter ein sehr grosses Weibchen von ca. 14 cm. Laenge und 320 Gramm Gewicht, sowie einige Maennchen, die zum Teil aehnliche blasse, rundliche Flecken zeigten, wie sie bei den Weibchen vorherrschen. Bei beiden Geschlech-

tern koennen die vorhandenen hellen Flecke verschwinden oder undeutlich werden. Sie koennen auch einen leicht gruenlichen oder blaeulichen Ton aufweisen, der besonders an den helleren Flecken erkennbar ist.

HYBRIDISMUS

Bei der nahen Verwandtschaft dieser Arten besteht natuerlicherweise die Frage, ob keine Hybriden vorkommen. Bisher liegt ein sicherer Anhaltspunkt dafuer nicht vor. Gewoehnlich wird in einer bestimmten Gegend nur eine der drei Arten gefunden. Nur im auessersten Sueden und in den La Platastaaten confluiren die Verbreitungsbezirke von *Bufo marinus* und *arenarius*, wenigstens teilweise. Die Parotiden zeigen bei den untersuchten Exemplaren keine Uebergaenge zwischen den beiden Typen.

Dass mehrere Individuen von demselben Fundorte Eigentuemlichkeiten in Zeichnung und Faerbung zeigen, welche an den normalen Typus einer anderen Art erinnern, die indessen im Gebiete nicht vorkommt, ist nicht gerade selten. Bei der enormen Fruchtbarkeit dieser Bufo-Arten liegt es nahe, anzunehmen, dass solche Tiere von demselben Elternpaare abstammen.

BUFO RUFUS GARMAN

Der Name *Bufo rufus* Garman ist in der Monographie von Nieden nicht zu finden und seitdem nur einmal in der Literatur von Barbour und Loveridge zitiert mit der Angabe von einigen Mustern im « Museum of Comparative Zoology » (sehr verfaerbt).

Es besteht kein Zweifel darueber, dass Garman's Spezies dieselbe Art ist, die fuenfzig Jahre spaeter von mir unter dem Namen *B. rubescens* beschrieben wurde. Die frueher bekannten Exemplare kamen von Goyaz, waehrend meine vom Staate Minas Geraes stammten, was aber von keiner grossen Bedeutung ist, da beide Staaten in weiter Ausdehnung verbunden sind.

Die Ausdehnung der roten und roetlichen Farbe ist wechselnd, fehlt aber bei Erwachsenen anscheinend niemals ganz, so dass sie nicht mit anderen Arten von Suedamerika verwechselt werden koennen. Bei diesen fehlt die rote Farbe ganz und gar, ausgenommen bei manchen Varietaeten von *B. crucifer*.

Zuweilen sind die Schwimmhaeute lebhaft rot gefaerbt, im uebrigen sind die angegebenen Masse genuegend verschieden, um keine Verwechslung mit *B. crucifer* zu gestatten. Es sind aber auch die Kaemme auf der Oberseite des Kopfes deutlich verschieden.

Die Parietalleiste ist ganz kurz und nicht nach innen gerichtet. Bei *B. rufus* fehlt eine Ocipital-Parietalleiste vollstaendig und die laengliche Parotide stoesst direkt an die breite Ocipitympanalleiste, ebenso wie das Trommelfell selbst. Dadurch unterscheidet sich die Art deutlich von *B. crucifer*. Miranda-Ribeiro bildet von diesem eine Varietaet ab, die er *roseanus* nennt, und die eventuell auf ein kleineres Exemplar von *B.* rufus bezogen werden koennte. Der Fundort ist leider nicht angegeben.

Vor kurzem sah ich zwei typische Weibchen von Arantes im Staate Minas, die Dr. Afranio do Amaral gehoeren. Eines derselben zeigt deutliche Querbaender auf der Rueckenseite der Extremitaeten, undeutliche dunkle Flecken auf dem Ruecken und stark hell und dunkel marmorierte Flanken und Innenseiten der Beine.

B. rufus, von dem ich ca. fuenfzehn Exemplare gesehen habe, ist durchschnittlich plumper als selbst die groessten Exemplare desselben Geschlechts bei *B. crucifer*. Die Maennchen erreichen eine Laenge von 8-9 cm, die Weibchen dagegen eine solche von 13 cm. Der erste Finger ist deutlich laenger als der zweite und an der Basis ziemlich dick. Die Schwimmhaeute zwischen der dritten, vierten und fuenften Zehe sind gut entwickelt und erreichen die halbe Hoehe der kuerzeren Zehe. Die Metatasalhoecker sind beide deutlich, die Rumpfseiten und besonders die Innenseiten der Beine sind deutlich desprenkelt. Der Bauch ist entweder weiss oder stellenweise vermikuliert. Die Hautwarzen koennen stark entwickelt sein, dagegen fehlt eine Paracnemis. Ich gebe nachtraeglich die Originalbeschreibung des *B. rufus* von Garman und die unabhaengig verfasste von *B. rubescens* von Lutz im Jahre 1925.

DESRCIPTIONS

Bufo rufus:

« From near Goyaz, on the highlands of East-Brazil, we have two specimens of a toad agreeing with this in size and outline which has been named *Bufo rufus* on account of the red color on the hinder half of the body. It differs principally in the small points or granulations which cover the ventral surface, in the paratoids which taper less and are more widened posteriorly, and in the coloration, which is a light rusty brown with indistinct spots of darker on the back, narrow bands and spots of brown on the thighs, and narrow transverse bands of the same on the legs, from the knee to the toes, and with the hinder parts, in life, tinted with red. The differences are certainly sufficient to mark these specimens as belonging to a distinct variety, and most pro-

bably other collections from this region will establish them as of specific value ».

Bufo rubescens:

« Length of male 8-9, of female up to 13 cm. Both sexes covered with lenticular warts with corneous points in the male, which may show black nuptial brushes on the three first fingers. Upper side brown or olivaceous while the unter side is white, very slightly mottled with black. The sides are more or less mottled. Sometimes dark cross bars appear on the limbs. Most peculiar is the brickred color of the cephalic crests and the limbs which may also appear like a rash on the ventral side and on the long and narrow parotids. The supra and retroocular crests join without forming an angle. Tympanum constantly oval ».

(I have observed more than fifteen individuals, sent from the Institute in Bello Horizonte, through the director Dr. Octavio Magalhães).

BUFO D'ORBIGNYI

Bufo d'Orbignyi wurde von Duméril und Bibron nach einem von d'Orbigny in Montevideo gesammelten Exemplar von 7 cm. Laenge beschrieben. Wie andere Kroeten, ist auch diese Art sehr variabel. Die Laenge scheint 7 cm. nicht zu uebertreffen. Ein heller, nach einigen Autoren gelber, Rueckenstreifen ist sehr haeufig. Die dorsale Grundfarbe konservierter Exemplare variiert von ockergelb ueber braun bis schwarz. Duméril und Bibron nennen das Colorit « olivâtre » mit weisser Unterseite und gelbem Rueckenstreifen. Mertens, der zwei Exemplare von Porto Alegre lebend beobachtete, erwaehnt die gruene Farbe nicht, vielleicht handelt es sich um ein Hochzeitskleid. Der Ruecken kann aehnliche dunkle Flecken zeigen, wie sie bei anderen Arten vorkommen, waehrend die Oberflaeche der Extremitaeten einige dunkle, zum Teil etwas abgekuerzte Querbinden aufweist. Die Seitenregionen koennen deutlich schwarz und weiss gesprenkelt sein.

Diese Art ist ueber Uruguay, Argentinien und Paraguay, aber auch ueber den brasilianischen Staat Rio Grande do Sul verbreitet. Sie wird oefters erwaehnt, aber selten eingehend beschrieben und ist meines Wissens nur von d'Orbigny abgebildet worden.

Von Montevideo, wo ich die Art vor langer Zeit lebend beobachtete, habe ich zurzeit nur einige juengere konservierte Exemplare, die indessen der Beschreibung entsprechen. Das abgebildete Exemplar stammt von S. Francisco de Paula, im Staate Rio Grande do Sul, wo es von

Dr. Cesar Pinto gesammelt wurde und ist ausgewachsen (L. 6,3 cm), aber in der Form der Kopfleisten etwas abweichend, und zeigt einen gewissen Grad von Melanismus, der hauptsaechlich an der Unterseite auffaellt, welche ungewoehnlich pigmentiert erscheint. Auch die Groesse des Trommelfells und seine Beziehungen zur Nachbarschaft sind etwas verschieden (siehe Figur Tafel 23). Man darf daraus kaum auf eine neue Art schliessen, sondern nur auf eine Variation, die lehrt, dass auch diese Charaktere etwas veraenderlich sind.

Hensel sah zahlreiche Exemplare von Porto Alegre, deren groesstes 66 mm. lang war. Berg, dessen Exemplare nicht ueber 60 mm. massen, gibt ein ausfuehrliches Literaturverzeichnis bis 1896.

Meine Exemplare aus Rio Grande do Sul sind von dunkler Farbe mit wenig auffaelliger Zeichnung. Sie unterscheiden sich von *Bufo arenarius* durch die nach innen gerichtete Parietalleiste und die weit kuerzere Parotis. Der Kopf ist kurz mit stumpfer, abgerundeter Schnauze. Der Oberkieferrand ist nach hinten zu etwas verbreitert und sieht in seiner ganzen Ausdehnung wie nach oben zu umgelegt aus. Kati Fernandez bespricht *B. d'Orbignyi* aus La Plata und seine Entwicklungen ausfuehrlicher Weise, erwaehnt eine dunkelgruene Faerbung auf dunklem Grunde, bezeichnet die Laenge mit 60 mm. und begleitet die Beschreibung mit einigen kleinen Photographien, die hauptsaechlich die Warzen zeigen.

Die Unterseite ist weiss gekoernt auf grauem Grunde oder deutlich dunkel vermikuliert, wie bei den von mir abgebildeten Exemplaren.

Lebende Exemplare von *Bufo d'Orbignyi* aus Porto Alegre stammend, sind zu Anfang der letzten zehn Jahre nach Deutschland gekommen und veranlassten Publikationen in der populaeren Zeitschrift fuer Aquarien- und Terrarienkunde (Jahrg. 35,. 1924, Seite 192 (Fritz Molle), Jahrg. 37, 1926, N.° 3, Seite 5, (Robert Mertens).

Einige einfache Abbildungen sind beigegeben. Von den an diesen gemachten Beobachtungen ist hervorzuheben, dass auch hier die gruene Farbe am lebenden Tiere beobachtet wurde.

BUFO GLOBULOSUS (GRANULOSUS) SPIX

Diese Art kennzeichnet sich durch geringe Groesse (Laenge 5 – 5,5 cm.), allgemeine Schieferfarbe aus hellen und dunklen Flecken zusammengesetzt und feinwarziges Intregument, welches die Knochenleisten des Kopfes und die laenglichen Parotiden undeutlich erscheinen laesst. Die Schnauze ist am Ende zwischen den Nasenloechern etwas vorgezogen und vorn quer abgestutzt, der ganze Kopf bildet meist ein leicht spitzwinkliges Dreieck, im Profil schraeg nach der Mundspalte abfallend, zwischen

dem Canthal und Supraorbitalleisten flach, Seitenraender des Rumpfes erweitert, sodass das Tier von der Flaeche gesehen, einen deutlichen birnenfoermigen Umriss zeigt.

Die ganze Unterseite ist auf hellgrauem Grunde weiss granuliert. Eine helle Dorsalbinde fehlt oder ist kaum angedeutet, dunkle Dorsalflecke sind haeufig aber wenig auffaellig. Der Farbenwechsel ist wenig ausgesprochen.

Mein suedlichstes Exemplar stammt von Campos, die noerdlichsten aus Maracay, Venezuela. In Bahia und Rio Grande do Norte waren sie haeufig zu finden. Sie sollen auch in Paraguay und dem noerdlichen Argentinien vorkommen.

Meine Arbeit ueber die Batrachien von Venezuela und Trinidad (1927) enthaelt gute Zeichnungen von P. Sandig der Ober- und Unterseite eines Maennchens aus Venezuela, die fuer die Tafel XXV verwendet wurden.

Dunkle Querbinden finden sich auch haeufig auf der Oberseite der Extremitaeten, Kehle des Maennchens gelblich und dunkel gefaerbt.

Nur bei ausgesprochenem Regenwetter hoert man die charakteristische Stimme dieser Art, die klingt, wie wenn man einen Sack mit trockenen Erbsen schuettelt. Auch die Tiere selbst kommen dann aus ihren Verstecken hervor.

B. globulosus Spix ist ein Name, welcher wie Berg betont, Prioritaet haben sollte, doch sind ihm die meisten Autoren darin nicht gefolgt, vielleicht weil sich der Name auf ein deformiertes Exemplar bezieht und daher nicht bezeichnend ist.

Eine Verwechslung dieser Art mit anderen derselben Lokalitaeten ist meines Wissens nicht zu befuerchten.

BUFO CRUCIFER WIED.

Die Kroete, die heutzutage meist unter obiger Bezeichnung angefuehrt wird, tritt unter verschiedenen Variationen auf, die leicht fuer verschiedene Arten gehalten werden koennen, wenn sie aus entlegenen Lokalitaeten stammen. Dies ist auch oefters geschehen, was zu einer reichen Synonymik gefuehrt hat, welche bei Berg und Nieden genauer verzeichnet ist. Wied hat zwar den Namen *crucifer* angegeben, hielt die Art aber fuer identisch mit *Bufo margaritifer* Laurenti (= *B. typhonius* Schn.), bezieht sich aber auf die Beschreibung von Daudin. Genauere Beschreibungen gab er unter dem Namen *ornatus* Spix und *cinctus* Wied 1825. Die Abbildungen von *cinctus* (1831) sind ganz deutlich. Wied hat selbst seinen Namen *crucifer* nicht in seiner Reisebeschreibung aufrecht erhalten, brauchte dagegen den Namen *ornatus* Spix.

Spix stellte fuenf Namen fuer ebenso viele brasilianische Kroeten auf, die er fuer verschiedene Arten hielt. Peters, welcher die Typen im Jahre 1872 untersuchte, stellte sie alle zu *crucifer*.

Es ist sehr schwer, von *B. crucifer* eine Beschreibung zu geben, weil alle die Charaktere, die fuer die verschiedenen Formen angegeben sind, entweder ohne Wert oder nicht konstant sind und mit einigen Modifikationen bei den verschiedenen Typen angetroffen werden.

B. crucifer ist eine gemeine Art und in verschiedenen Variationen ueber den groessten Teil von Brasilien verbreitet. Sie aendert in Groesse und Faerbung vielfach ab, ist aber durchschnittlich weniger voluminoes und schlanker als *paracnemis*, *marinus* und *arenarius*. Die Knochenkaemme des Kopfes sind ausgesprochen, aber nicht besonders charakteristisch. Ein Parietalkamm kann angedeutet oder ausnahmsweise gut entwickelt sein. Der Oberkieferrand ist besonders nach hinten deutlich verbreitert und die Mundspalten meist heller gesaeumt.

Die Parotiden variieren in ihrer Form, sind aber immer kurz und und meist schmal, von dem vordersten Teile abgesehen. Die Warzen der Dorsalseite sind oft sehr reichlich, dagegen ist die Verhornung meist weniger ausgesprochen als bei den angefuehrten Arten. Die Bauchseite ist immer dicht, aber fein granuloes. Fuer die Beschreibung der Art scheint es mir zweckmaessig, die verschiedenen Variationen aufzuzaehlen und zu diskutieren, welche zur Aufstellung der einzelnen Namen gefuehrt haben. Diese Namen koennen dem Artnamen *crucifer* beigefuegt werden, um die einzelnen Typen zu bezeichnen. Man muss sich aber darueber klar sein, dass diese Typen ineinander uebergehen. Der erste Typus, den ich *B. crucifer inornatus* nenne, ist in Rio und der Naehe des Instituts nicht selten. Im August habe ich eine groessere Anzahl von Exemplaren untersucht, (meist ausgewachsene Maennchen), die alle diesem Typus folgten. Auch die konservierten Exemplare aus frueherer Zeit zeigten jetzt deutlich diesen Typus. Die Laenge dieser Tiere erreichte 9-10 cm; die Weibchen sind meist groesser, ausnahmsweise findet man Individuen mit bis zu 13 cm Laenge. Die Grundfarbe des Rueckens ist sehr variabel; sie kann im allgemeinen als eine Schutzfarbe gelten, welche der Faerbung mancher Erdsorten, wie Sand, Lehm verschiedener Arten, Gartenerde, oder der Farbe abgefallenen Laubes entspricht. Die ganze Oberseite hat dieselbe Faerbung und nur an den Extremitaeten finden sich Andeutungen von dunkleren Querbinden. Die Seitenflaeche des Koerpers und die Innenflaeche der Schenkel zeigen keine auffallende Marmorierung, doch koennen dunkle Flecke vorhanden sein. Die Unterseite ist immer heller, grau oder weiss und zeigt nur wenige und undeutliche dunkle Flecken. Ein heller Rueckenstrei-

fen, wie er bei anderen Formen haeufig ist, kann hier ganz fehlen oder nur leicht angedeutet sein.

Auch das Trommelfell mit dem umgebenden flachen Seitenfelde kann dieselbe Erdfarbe zeigen, doch tritt haeufig eine staerkere Pigmentation ein, welche sich sehr intensiv und charakteristisch gestalten kann. Sie hat Veranlassung zu dem Namen *melanotis* gegeben, der sehr bezeichnend waere, wenn dies auffallende Merkmal regelmaessig vorkaeme. Es besteht darin, dass das Trommelfell und ein um dasselbe gelegene, nach hinten breitere Feld stark pigmentiert ist, gewoehnlich schwarz, zuweilen nur dunkel rotbraun. Bei *melanotis* wird auch ein heller Rueckenstreifen angefuehrt. Diesem Typus entsprechen viele Exemplare von Rio, er kombiniert sich aber auch mit den anderen unter verschiedenen Namen beschriebenen Typen.

Das schwarze Tympanalfeld verlaengert sich oefters nach hinten, entweder nur in der Form schwarzer Flecken und Striemen oder als breite schwarze Binde, die bis zum Hinterende reicht. Dies wird auch als Hauptcharakter von *B. cinctus* Wied angefuehrt. Bei diesem kommen indessen neue Charaktere hinzu, unter denen namentlich gelbe Flecke in den Weichen und an der Innenseite der Oberschenkel hervorzuheben sind. Wied gibt eine detaillierte Beschreibung und farbige Abbildung je eines Maennchens und Weibchens. Er fand seinen *B. cinctus* hauptsaechlich in Espirito Santo und speziell in der Gegend von Victoria. Ich habe kein Material von da, dagegen erhielt ich durch die Guete von Dr. Nelson Davis, Ende August und Anfang September 45 Exemplare eines Bufo von Bahia, der ohne Zweifel denselben Typus darstellt, der von Wied *B. cinctus* genannt wurde. Eine gelbe Marmorierung an den gewoehnlichen Stellen, Weichen und Innenseite der Oberschenkel ist konstant. Haeufig finden sich gelbe Flecke auch in weiterer Ausdehnung. Die Rueckenfarbe dieser Art war meist hell terracotta, aendert sich aber oefters waehrend der Beobachtung. Die gelbe Faerbung tritt meistens in rundlichen oder laenglichen Flecken auf, sie ist nicht sehr brillant und war zuerst ein helleres etwas roetliches ockergelb. Spaeter wurde sie etwas lebhafter und mehr weisslich oder mehr schwefelgelb. Die dunklen Querbinden auf den Extremitaeten waren meist recht deutlich. Der weisse oder ins gelbliche endende Rueckenstreifen war gewoehnlich breit und manchmal schwarz eingefasst. Der Kopf mit Einschluss des oberen Augenlides und der Parotiden, sowie die Randpartien des Rueckens waren nicht selten deutlich heller. Die Rueckenseite der Oberschenkel war oft in weiter Ausdehnung geschwaerzt. An den Seiten der Bauchflaechen zeigten sich dunkle Vermikulationen. Die Exemplare veraenderten sich waehrend der laengeren Beobachtung nicht unbedeutend in der Faer-

bung und es waere unmoeglich, einen richtigen Begriff dieser Form zu geben, wenn man nur einzelne Individuen eingehend beschreibt. Meine Exemplare aus Rio zeigen keine gelbe Faerbung, die derjenigen von cinctus entspricht, mit Ausnahme eines Weibchen, bei denen gelbliche Flecke waehrend der Beobachtung entstanden.

BUFO CRUCIFER VAR. STELLATA (BUFO STELLATUS SPIX)

Ich erhielt diese Form in einem grossen und zwei kleineren Exemplaren aus Caruarú im Staate Pernambuco von Dom Pedro Pickel. Das groesste Exemplar, ein Maennchen, erreicht die Laenge von 8,5 cm. und stimmt mit *crucifer* in den Kopfleisten und dem schwarzen Feld um das Trommelfell ueberein. Die Rueckenseite ist hellbraun mit zahlreichen spitzigen Warzen und undeutlicher hellerer Vertebralbinde. Parotiden etwa von Form und Groesse eines Mandelkerns. Bauchseiten und Innenflaechen der Schenkel mit schwefelgelben Flecken geschmueckt, die an den Schenkeln mehr unregelmaessig und teilweise strichfoermig sind, Unterseite hell. Erster Finger laenger als der zweite, beide mit schwarzen Kopulationsbuersten, dritter und vierter an der Basis durch eine Membran verbunden, Zehen mit Schwimmhaut an der Basis, Metakarpal- und Metatarsalhoecker deutlich, die inneren laenger und schaerfer. Oberkieferraender besonders nach hinten zu verbreitert und etwas vorspringend.

Auch die kleineren, weniger gut konservierten Individuen zeigen Spuren derselben Schmuckfaerbung.

Die Henselsche Form aus Rio Grande do Sul zeigt Charaktere von *ornatus* Spix und *melanotis* (Duméril und Bibron), steht aber besonders dem *cinctus* Wied nahe und ist nicht sicher von ihm zu trennen. Ich berichte kurz ueber die hierher gehoerigen Formen und gebe ein Bild.

BUFO CRUCIFER var. Henseli

Ein frisches Exemplar von São Bento, Santa Catharina, wurde aquarelliert. Dasselbe ist von *B. stellata deutlich* verschieden, schlanker und kleiner, die Laenge betraegt nur 7,5 cm., der Kopf ist in der Naehe der Mundwinkel 27 mm. breit und stark vorspringend, der Ruecken namentlich nach der Mitte zu deutlich kupferrot. Die Haut ist nahezu glatt. Ein weisser Medianstreifen geht von der Orbitalregion bis nahe an die Coccygealgegend. Der Rest der Oberseite ist hellgrau und leicht lilafarben. Die Extremitaeten haben einige ziemlich breite und von einander entfernte dunkle Querbinden, Seiten des Leibes hell und dunkel marmoriert. An der Innenseite der Hinterschenkel zwei Reihen gelber

Flecken, zum Teil sichelfoermig, mit nach vorne gerichteter Konkavitaet. Die Unterseite ist granuliert, schwaerzlich grau und mit einigen dunkleren verwischten Flecken an der Kehle, den Seiten und den Beinen. Die Metatarsal- und Metacarpalhoecker sind laenglich und von heller Farbe. Es handelt sich anscheinend um ein Weibchen, das alle Eier abgelegt hatte.

Zur selben Art gehoert voraussichtlich ein weniger gut erhaltenes Maennchen von Grammado im Staate Rio Grando do Sul, am 22. I. 31 von Dr. Caesar Pinto fuer uns gesammelt. Dasselbe zeigt sehr deutlich langgestreckte, hellgefaerbte und schmale Parotiden, von ueber 15 mm. Laenge. Die Laenge des Koerpers erreicht 5 cm. bei einer Breite von nicht ganz 2 cm. Die Extremitaeten sind schlank, aber beide Vorderarme deutlich verdickt, die Kopulationsbuersten sind nicht zu erkennen. Der Koerper ist mit kleinen und flachen Warzen dicht besetzt. Die Querbinden an den Extremitaeten sind vorhanden, aber weniger deutlich. Die Vertebralbinde stimmt nicht mit den anderen Exemplaren ueberein. Es handelt sich um ein Maennchen mit deutlichen langgestreckten hellen Testikeln.

Hensel hat eine Kroete aus den Urwaeldern des Staates Rio Grande do Sul beschrieben, die ich geneigt bin, als mit meinen oekologisch mehr uebereinstimmenden, in Beziehung zu bringen. Ihre Formen weisen allerdings mehr Gelb auf. Sie waren aber *in copula* gefangen und es handelte sich wohl um ein Hochzeitskleid.

Bufo scaber Spix ist ein 66 cm langes Exemplar, das in der Abbildung von grauer Lehmfarbe erscheint (im Text spricht Spix von *olivaceobrunneus*, was nicht dazu stimmt). Man koennte es als *crucifer inornatus* bezeichnen, wenn nicht gelbe Flecke an der Innenseite der Oberschenkel angegeben waeren. Die Kennzeichen von *melanotis* fehlen. So bildet es einen Uebergang von *inornatus* zu *cinctus*. Ein aehnliches Exemplar habe ich von Rio de Janeiro. In Minas scheint die Form nicht selten.

Bufo dorsalis ist ein aehnliches, aber kleines Individuum (*Bufo scabro et ornato affinis*); alle fuenf Exemplare von *scaber* und des Typus *dorsalis* stammen aus der Provinz Rio.

Bufo semilineatus ist ein ganz junges Exemplar (1 3/4"), bei dem der Rueckenstreifen nur hinten ausgepraegt ist, ein ganz bedeutungsloses Merkmal. Das Exemplar stammt vom Fluss Itapicurú (Bahia?). Der Name verdient nicht aufrecht erhalten zu werden.

BUFO ORNATUS SPIX.

In der Stadt Rio fand ich frueher oefters kleinere Individuen, die der Beschreibung und Figur von Spix « Reise nach Brasilien », Band II, Seite 132, entsprachen. Auch Hensel hat dann ein solches Exemplar von Rio gesehen. Bei diesem Individuum nimmt der Ruecken eine gelbrote Faerbung an, die sich bis zu ziegel- oder kupferrot steigern kann. Der Rueckenstreifen ist deutlich ausgesprochen und auf diesen fussen ziemlich weit getrennte schwarze Flecke, die sich seitlich fortsetzen, wodurch eine, meist sehr undeutliche Form eines vierfachen Kreuzes entsteht, wegen welcher Wied den Namen *crucifer* aufstellte. Solche Exemplare waren meist klein, oft kaum halbwuechsig, ein solches Exemplar hat Spix unter dem Namen *B. ornatus* abgebildet. Er gibt auch den Fundort als Provinz Rio de Janeiro an. Die Rueckenfarbe des Tieres ist indessen weit heller als sie gewoehnlich gefunden wird. Unter meinem Material von Bahia fand sich ein 5 1/2 cm. langes Individuum, bei dem die fuer *B. crucifer* charakteristische Rueckenzeichnung deutlich vorhanden war, kombiniert mit den gelben Flecken, wie sie fuer *B. cinctus* charakteristisch sind. Der schwarze Seitenstreifen war deutlich, aber sehr schmal, das Trommelfell graubraun und vorn von einem halbmondfoermigen schwarzen Flecke begrenzt. Die kupferrote Grundfarbe des Rueckens verwandelte sich im Alkohol in ein schmutziges Grau. Es handelt sich um ein jugendliches, nicht geschlechtlich reifes Individuum.

Eine solche Faerbung, wie sie *ornatus* entspricht, findet sich nicht bei grossen Individuen und duerfte daher als eine Faerbung von jungen Tieren gelten. Schwarze Rueckenflecke findet man vereinzelt auch bei grossen Individuen. Sie stehen aber von der Mittellinie entfernt und erinnern mehr an die dunklen Flecke, welche gelegentlich bei anderen Kroetenarten vorkommen.

Das Resultat aller meiner Untersuchungen ist, dass man wohl einige Formen unterscheiden kann, dass dieselben aber ineinander uebergehen und auch sehr viele Mischformen vorkommen.

Miranda-Ribeiro hat eine Form als var. *phrimeri* abgebildet, ohne den Fundort anzugeben. Dieselbe ist durch ihre dunkle Oberseite und die weitgehende Pigmentierung der Unterseite, welche nur getrennte runde weisse Flecke zeigt, als eine hochgradig melanistische Abweichung charakterisiert. Unter meinen zahlreichen Exemplaren findet sich kein ganz aehnliches, wohl aber zeigen einige Stuecke einen geringeren Grad von Melanismus, der sich an der Bauchseite durch schwaerzliche Vermikulationen kennzeichnet.

Die als *Bufo crucifer* var. *roseana* abgebildete Form, deren Fundort nicht angegeben wird, ist, wie schon bemerkt, von *Bufo rufus* nicht sicher abgegrenzt. Wenn sie nicht zu diesen zu rechnen ist, handelt es sich um eine wenig verbreitete, mehr individuelle Varatiion.

BUFO TYPHONIUS SCHNEIDER (L. 1785), MARGARITIFER LAURENTI 1788.

Diese Art ist laengst bekannt und auch wiederholt beschrieben worden, am ausfuehrlichsten von Duméril und Bibron unter dem Namen von Laurenti nach Exemplaren aus Cayenne und Brasilien. Man erhaelt indessen kein gutes Bild von derselben, weil die meisten der angefuehrten Merkmale nicht konstant oder nicht gerade spezifisch sind. Die Art ist offenbar sehr variabel und je nach den Alterszustaenden sehr verschieden. Die ersten Beschreibungen aus Brasilien sind von Spix, aber nahezu wertlos, ebenso die begleitenden Abbildungen, die unter drei oder vier verschiedenen Namen drei oder vier junge Exemplare darstellen.

Die Verbreitung der Art geht ueber den Norden von Suedamerika mit Einschluss von Ecuador. Im Amazonasgebiet scheint sie nicht besonders selten, indessen beschraenkt sich mein Material auf fuenf schon aeltere, aber nicht schlecht konservierte Exemplare aus Britisch Guiana und Barro Colorado, Kanalzone. Dieselben zeigen zwar die eigentuemliche Form des Oberkiefers, aber die kegelfoermigen Warzen des Vorderrueckens, die zu dem Namen *margaritifer* Veranlassung gaben, fehlen ganz; auch der Kopf ist nicht besonders spitzig. Dagegen ist der Oberkiefer deutlich verbreitert und seitlich spitz vorspringend. Dasselbe gilt von einigen jungen Exemplaren von Barro Colorado, bei denen die Kopfkaemme noch wenig entwickelt sind. Die von Duméril und Bibron angegebene lockere Verbindung der Haut des Hinterkoerpers ist auch nicht deutlich; nur sind die Seitenregionen von Koerper und Oberschenkel durch eine lockere Hautfalte verbunden. Der helle Rueckenstreifen ist auch bei anderen Arten haeufig und bei meinen Exemplaren nicht oder kaum erkennbar.

Boulenger gibt ein Bild der Oberseite des Kopfes und Baumann bildet dieselbe in den verschiedenen Altersstufen ab. Sonst sind mir von Darstellungen des ganzen Tieres nur diejenigen von Spix und Miranda-Ribeiro bekannt. Ersterer begleitet die Zeichnungen von drei oder vier jungen Exemplaren mit ebenso vielen kurzen Beschreibungen, die fuer die Kenntnis der Art wertlos sind.

Dagegen gibt Miranda-Ribeiro kolorierte Darstellungen, eines erwachsenen Maennchens in ziemlich lebhaften Farben, die vielleicht ein

Hochzeitskleid darstellen. Das Bild der Ober- und Unterseite ist gut, weniger gelungen erscheint die Seitenansicht, auf welcher indessen die perlartigen Warzen im Profil erscheinen. Sein Exemplar stammt von Aripuanan.

Auf der Figur von Miranda-Ribeiro erkennt man sofort dunkle Rueckenflecke, wie sie bei anderen brasilianischen Arten haeufig sind, ausserdem auch vier weisse Flecken, der Grund des Rueckens scheint roetlich. Diese Merkmale sind indessen nicht konstant und die konservierten Exemplare zeigen eine schmutzig gelbe oder braeunliche Farbe, wie sie verschiedenen Erden entspricht; sie kann wohl als eine Art Schutzfaerbung gelten. Auf den Extremitaeten koennen mehr oder weniger deutliche Querbinden vorhanden sein. Die Unterseite ist immer heller und fein granuliert, grau oder gelblich weiss und mit wenig ausgesprochener dunkler Punktierung. Im allgemeinen kann man wohl sagen, dass *B. typhonius* in seiner Faerbung und Zeichnung den verschiedenen Typen von *B. crucifer* entspricht, er steht diesem auch in anderer Beziehung sehr nahe. Die eigentuemliche Bildung des Kiefers, die bei *crucifer* schon etwas angedeutet ist, bleibt immer noch das sicherste und das beste Merkmal. Die Parietalleiste ist nicht immer so deutlich wie sie die Zeichnung von Boulenger gibt und eine Andeutung derselben kann auch bei *crucifer* bestehen. Was die Groesse anbetrifft, so fehlt es etwas an Angaben. Die erwaehnten Exemplare haben eine Laenge von nahezu 6 cm. oder etwas mehr, doch laesst die Abbildung von Boulenger auf ein weit groesseres Exemplar schliessen.

Fuer diese Art hat Cuvier den Genusnamen *Othilophus* aufgestellt, der aber mit Recht von den meisten Autoren nicht gebraucht wird. Ganz verschollen sind die auf die Abbildungen von Spix gegruendeten Genusnamen.

ERKLAERUNG DER TAFELN XIII—XXVII

TAFEL XIII

Oben von links nach rechts: *Bufo marinus*, zwei Maennchen und zwei Weibchen von Pindamonhangaba, Groesse 1/3.

Unten von links nach rechts: *Bufo paracnemis*, Maennchen und Weibchen von Pennapolis, Staat São Paulo.

TAFEL XIV

Dieselben von der Unterseite, 1/3 natuerlicher Groesse.

TAFEL XV

Bufo paracnemis, Oberseite, Maennchen.

TAFEL XVI

Bufo paracnemis, Unterseite. Herkunft Neu-Europa. Groesse 9 cm. Man sieht die Kopulationsbuersten an den ersten Fingern.

TAFEL XVII

Bufo paracnemis von Olinda, (Pernambuco), Weibchen, erwachsen, mit grossen Flecken auf der Rueckenseite, 2/3 natuerlicher Groesse.

TAFEL XVIII

Bufo paracnemis von Pirajá, (Bahia), mit breiten Vermikulationen an der Unterseite, erwachsenes Weibchen, 1/2 der natuerlichen Groesse.

TAFEL XIX

Bufo marinus, melanistische Formen, (Neu-Freiburg). Oben: Maennchen in der Mitte, Weibchen auf beiden Seiten, unten: Bauchseite derselben, Groesse 1/3.

TAFEL XX

Bufo arenarius, oben von links nach rechts: Weibchen und Maennchen mit aehnlicher (weiblicher) Zeichnung, unten: gefleckles Weibchen und Maennchen ohne Flecken. Groesse 1/3.
Maennchen ohne Flecken. Groesse 1/3.

TAFEL XXI

Fig.1 Oben: *Bufo rufus* Garman (*rubescens* Lutz). Maennchen von Minas Gerais, 3/4 natuerlicher Groesse.
Unten: *Bufo d'Orbignyi*, Weibchen, São Francisco de Paula, Staat Rio Gr. do Sul, natuerliche Groesse, Zeichnungen von P. Sandig (1) und A. Pugas (2).

TAFEL XXII

Fig. 1 *Bufo crucifer*, Weibchen, Rio de Janeiro, natuerliche Groesse.
Fig. 2 *Bufo crucifer var. stellata*, Maennchen von Caruarú, Staat Pernambuco, Laenge 8 1/2 cm.

TAFEL XXIII

Bufo crucifer var. Henseli, Maennchen, São Bento, Staat Santa Catharina, natuerliche Groesse, die dunkle Partie des Rueckens ist kupferfarben. Zeichnung von P. Sandig.

TAFEL XXIV

Fig. 1 *Bufo crucifer* von Bahia mit den Charakteren von *cinctus* Wied und Anklaengen an *ornatus* Spix. Natuerliche Groesse.

Fig. 2 *Bufo crucifer* Wied von Bahia, junges Exemplar, entsprechend *ornatus* Spix und den gelben Flecken von *cinctus* Wied. Natuerliche Groesse.

TAFEL XXV

Bufo globulosus Spix, Maennchen von Maracahy, (Venezuela). Oben: Rueckenseite, unten: Bauchsite. Natuerliche Groesse.

TAFEL XXVI — KOPFKAEMME (Gr. 1/1).

Fig. 1 *Bufo paracnemis*, Weibchen von Pindamonhangaba (S. Paulo).

Fig. 2 *Bufo marinus*, Weibchen von Novo Friburgo, (Staat Rio de Janeiro).

Fig. 3 *Bufo arenarius*, Weibchen von Buenos Aires. Alles in natuerlicher Groesse. Zeichnungen von A. Pugas.

TAFEL XXVII — KOFPKAEMME (Gr. 1/1).

Fig. 1 *Bufo d'Orbignyi*, Weibchen von São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul.

Fig. 1a *Bufo d'Orbignyi*, Maennchen von Buenos Aires.

Fig. 2 *Bufo crucifer var. Henseli*, Weibchen von Gramado, Rio Grande do Sul.

Fig. 3 *Bufo crucifer*, Rio de Janeiro.

Fig. 4 *Bufo rufus*, Staat Minas Gerais.

Fig. 5 *Bufo crucifer var. stellata* v. Spix, Caruarú, Staat Pernambuco.

Fig. 6 *Bufo globulosus* Spix, Natal, Rio Grande do Norte.

Fig. 7 *Bufo typhonius*, Kataarbo, Br. Guiana.

Fig. 8 *Kopf einer Bufoart mit vorspringenden Knochenleisten*: c. Cathalleiste, ot. Orbitotympaalleisnte, p. Parietalleiste, pro, Praeorbitalleiste, pto. Postorbitalleiste, spo. Supraorbitalleiste. Kopie einer halbschematischen Zeichnung von Nieden.

Estudo sobre o Trichodectes do furão (*)

(Mallophaga)

por

FABIO LEONI WERNECK

(Com 5 figuras no texto)

O furão, *Galictis vittata*, um dos poucos mustelideos do Brasil, é frequentemente parasitado por uma especie de *Trichodectes*. Os exames que procedemos em numero elevado de animais capturados em diversos pontos de nosso paiz, mostraram que raramente se encontra um individuo livre desse parasito, que parece lhe ser exclusivo pois nunca o encontramos noutro hospedador.

A referencia mais antiga encontrada sobre a especie em questão foi feita por Neumann em 1911, a quem se deve bons desenhos e descrição minuciosa. Neumann, entretanto, julgou ter em mãos especie já conhecida e encontrada em mustelideos da America do Norte. Devemos convir que naquela epoca a literatura existente sobre o *Trichodectes mephitidis* era insuficiente, mas nem por isso sua identificação foi menos leviana pois o caso requeria um exame de material norte-americano, que certamente o teria levado á outra conclusão.

Dois anos depois, Stobbe, provavelmente influenciado pelo trabalho de Neumann, classificou do mesmo modo exemplares pertencentes ao Museu Zoologico de Berlim e que tinham sido encontrados num furão de Piracicaba.

Finalmente, em 1915, Kellogg e Ferris na monographia que publicaram, intitulada « The Anoplura and Mallophaga of North American Mammals », reconhecem o erro de identificação de Neumann, sem outras considerações sobre o parasito sul-americano. Relacionando os hospedadores do *Trichodectes mephitidis*, dizem apenas os citados autores: «It has also been recorded from a South American skunk (Choro, Bolivia), this record, however, being erroneous ».

Estudando o *Trichodectes* do furão ficamos convencidos de que deve ser considerado especie nova, proxima das que se grupam em torno do *Trichodectes mephitidis* e das quais se distingue por caracteres

(*) Recebido para publicação a 4 de Dezembro de 1933.

diferenciais indiscutiveis, encontrados nas genitalias, na disposição das cerdas abdominais, etc. Esta convicção baseia-se na bibliografia publicada á respeito e no exame de material norte-americano e europeu que temos á nossa disposição.

Á nova especie damos o nome de *Trichodectes galictidis*, que lembra seu hospedador tipo. Dela, damos adeante desenhos que acreditamos contribuirem para seu melhor conhecimento e uma resumida descrição, pois que a publicada por Neumann nos parece bastante minuciosa.

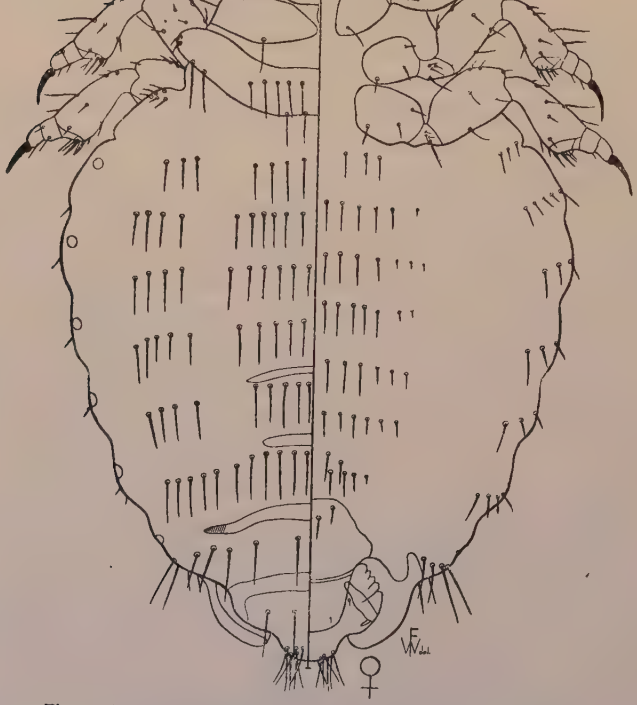


Fig. 1. *Trichodectes galictidis*, femea, face superior e inferior.

Trichodectes galictidis sp. n.

1911 — *Trichodectes mephitidis* Neumann, (nec Packard). Notes sur les Mallophages III. Archives de Parasitologie, tomo XV, pags. 618-620, fig. 10.

Descrição:

Femea (fig. 1). Comprimento: 1.55 mm.

Cabeça mais larga do que longa, tendo a porção pré-antenal curta e delimitada pela margem anterior, de grande curvatura. Temporas ligeiramente arredondadas e occipital pouco saliente. Tanto na face superior, como na inferior, encontram-se muito poucos pelos e, nelas, deve-

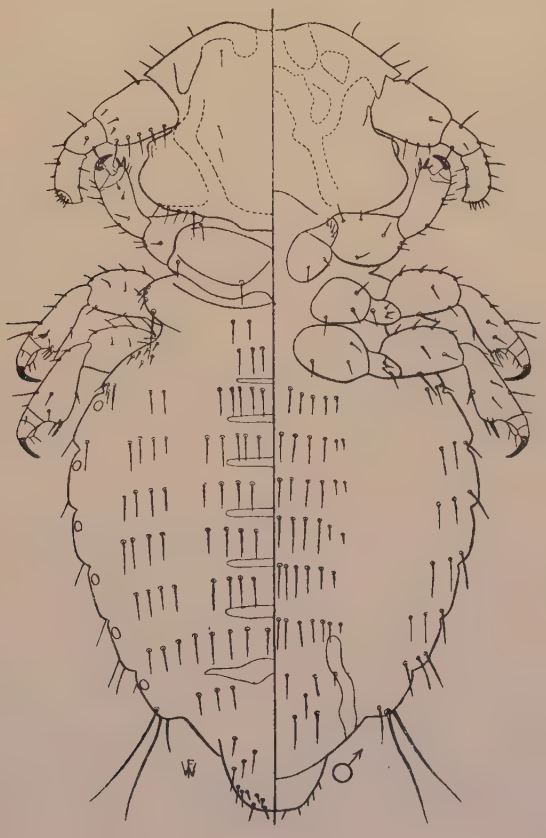


Fig. 2. *Trichodectes galictidis*, macho, face superior e inferior.

se notar apenas formações quitinosas em forma de ganchos, junto ás margens laterais e um pouco adeante do sinus antenal.

Na borda anterior e na temporal existem poucos pelos, sendo os desta ultima mais longos e fortes.

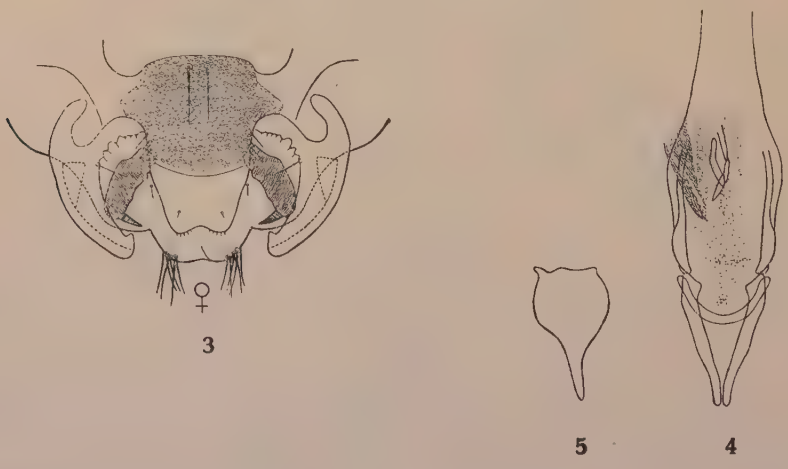
Antenas formadas de tres segmentos; o primeiro muito mais grosso que os outros e o terceiro mais comprido que o segundo. No primeiro articulo encontra-se uma fileira de cinco pelos longos junto á borda pos-

terior e no ultimo numerosas cerdas em ambas as margens; o segmento mediano é o que menos pelos apresenta.

Torax curto e largo. O metatorax é muito mais largo que os outros segmentos, tendo as extremidades laterais, onde se encontram espinhos curtos e recurvados, fortemente salientes. O mesotorax ocupa pequena area na face superior do torax, na face inferior do qual não se encontram placas esternais.

Abdomen muito largo, de comprimento ligeiramente superior á sua maior largura, que se encontra ao nivel do terceiro segmento abdominal, e quasi desprovido de placas pigmentadas, presentes unicamente nos ultimos tergitos.

Bordas laterais onduladas, tendo na parte posterior sómente dois pares de cerdas de maior importancia, um de cada lado, pois que as outras ahi encontradas são de comprimento muito reduzido.



Trichodectes galictidis: 3. Genitalia da femea. 4. Genitalia do macho. 5. Paramero visto de lado.

A extremidade posterior do abdomen, onde se encontram dois tufos laterais de cerdas, é bastante saliente e tem os flancos revestidos pelos gonopodos.

A face superior é guarnecida de cerdas dispostas em fileiras transversais, uma para cada segmento abdominal, fileiras estas continuas nos ultimos segmentos e interrompidas nos outros, de modo a formarem tres grupos de cerdas: um mediano e dois laterais. Na face inferior, as cerdas, separadas sempre por espaços iguais, formam fileiras regulares, mas as que ocupam as extremidades são muito menores que as centrais, o que não sucede na face superior. Os pleuritos, mal delimitados, tem pequenas cerdas bordando suas margens posteriores.

A genitalia acha-se representada na figura 3, abstendo-nos por isso de descrevel-a.

Macho (fig. 2). Comprimento: 1.43 mm.

Semelhante á femea pela maioria de seus caracteres, dela se distingue, entretanto, facilmente pela diferença de forma das antenas e da extremidade posterior do abdomen.

O primeiro articulo antenal do macho é muito maior que o da femea, não só mais grosso como mais comprido. O ultimo é de forma inteiramente diversa, como diversa é tambem a relação de comprimento entre este articulo e o primeiro.

A extremidade posterior do abdomen é mais pontuda, os pares de cerdas marginais mais longos e as placas pigmentadas dos tergitos mais numerosas.

A genitalia (fig. 4) é formada duma placa basal larga, terminada em dois longos ramos, onde se articulam os parameros, cujas extremidades distais tocam-se na linha mediana. Vistos de cima ou de baixo apresentam a forma da figura 4, porém examinados noutra posição apresentam-se em forma de raqueta (fig. 5). O pseudo-penis é curvo e transversalmente disposto. A vesicula penis apresenta em meio de seu comprimento uma serie de espinhos fortes, recurvados e semelhantes ás unhas dos felinos.

Tipo: Lamina 509, com uma femea.

Alotipo: Lamina 514, com um macho.

Paratipos: Laminas 508, 510, 511, 512, 513 e 515 com cinco femeas e nove formas jovens e abundante material não montado no frasco n.º 6. Todo o lote tipo pertence á nossa coleção.

Hospedador tipo: *Galictis vittata.*

Sobre algumas especies brasileiras da ordem Mallophaga (*)

por

FABIO LEONI WERNECK

(Com 14 figuras no texto)

No presente trabalho descrevemos trez especies novas, encontradas no decorrer dos estudos que estamos procedendo sobre as Mallophagas dos mamiferos do Brasil e corrigimos pequenas falhas cometidas nas descrições originais de especies, das quais nos ocupamos anteriormente. Outrosim, servimo-nos da oportunidade que se nos apresenta para estabelecer os hospedadores tipos de algumas especies nossas, o que não nos foi possivel fazer ao descrevel-as pela falta de determinação dos mesmos. Devemos agradecer aos naturalistas do Museu Britanico que cooperaram nesse sentido: ao Sr. Hayman que, gentilmente, se desobrigou dessa tarefa e aos Srs. Thompson e Hinton que atenderam á nossa solicitação.

Gliricola fonsecai Werneck.

Os ratos portadores dessa especie foram identificados como *Nelomys* sp. Jourdain.

Gliricola mezomydis Werneck.

Hospedador tipo: *Euryzygomatomys spinosus catellus* Thomas.

Tetragyropus cruzi Werneck.

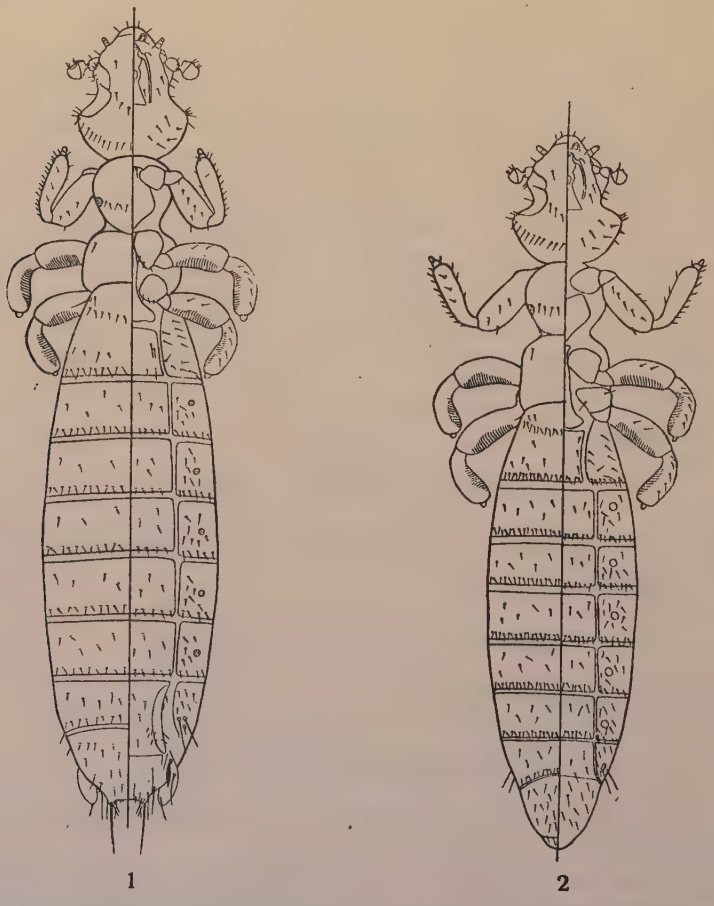
Hospedador tipo: *Euryzygomatomys spinosus catellus* Thomas.

Nos desenhos publicados sobre esta especie, deixamos de representar duas cerdas longas que se encontram nos bordos antero-externos do esternito mesotoracico. Esta omissão foi notada pelo Sr. J. A. Rosas Costa, de La Plata, a quem enviamos um especimem de *Tetragyropus cruzi*.

(*) Recebido para publicação a 12 de Janeiro de 1934.

Gliricola echimydis Werneck.

No desenho da genitalia da femea, que acompanha a descrição original, representamos, de cada lado da linha mediana e junto ao bordo posterior do abdomen, duas cerdas espatuladas e trez do tipo comum. Exame mais cuidadoso nos permitio verificar serem todas espatuladas, motivando nosso erro o facto de se apresentarem, algumas delas, de perfil e de só se corarem bem na nervura mediana, o que torna o limbo quasi invisivel.



1 2

Gliricola brasiliensis: 1. Femea, face superior e inferior. 2. Macho, face superior e inferior.

Gliricola brasiliensis n. sp.

Descrição:

Femea (fig 1). Comprimento: 1.36 mm.

Cabeça (fig. 3) alongada; sensivelmente mais comprida do que

larga. Largura maxima ao nivel das temporas que ultrapassam, de muito, o angulo anterior do sinus antenal. Fossas antenais pouco pronunciadas. Palpos maxilares longos e bem visiveis. Poucos pelos encontram-se nas margens da cabeça: um pequeno grupo nos angulos temporais, um outro nas espanções que precedem as fossas antenais e alguns pelos isolados na margem anterior. Na face superior nota-se uma fileira regular de pelos curtos, proxima ao bordo occipital.

Protorax subesferico e pterotorax subcilindrico. Esternitos toracicos representados na fig. 4. Membros sem nenhuma particularidade digna de nota.

3

4

Gliricola brasiliensis: (Femea). 3. Cabeça, face superior e inferior. 4. Placas esternais.

Abdomen estreito e longo, tendo de comprimento 2/3 do comprimento total do inseto. Margens laterais sem reentrancias ao nivel das articulações dos segmentos abdominais e quasi desprovidas de pelos, notando-se apenas um, pequeno, junto ao bordo posterior do torax e dois outros, de pouca importancia tambem, no ultimo pleurito. Segmentos abdominais tipicos com uma carreira de pelos muito pequenos ao longo das margens posteriores e alguns outros, em pequeno numero, irregularmente implantados. Nos pleuritos estes ultimos são mais numerosos.

Genitalia (fig. 5) formada de gonopodos grandes e salientes. Das cerdas aí presentes, sómente duas são espatuladas.

Macho (fig. 2). Comprimento: 1.10 mm.

Semelhante á femea. Abdomen relativamente mais curto e com a estremidade posterior mais afilada.

Genitalia (fig. 6) com placa basal muito longa e fina, dividida

em dois ramos terminais compridos e curvos. Os parameros são, tambem, longos, finos e recurvados.

Hospedador tipo: *Cavia porcellus* Lin.

Tipo: Lamina 997 com uma femea.

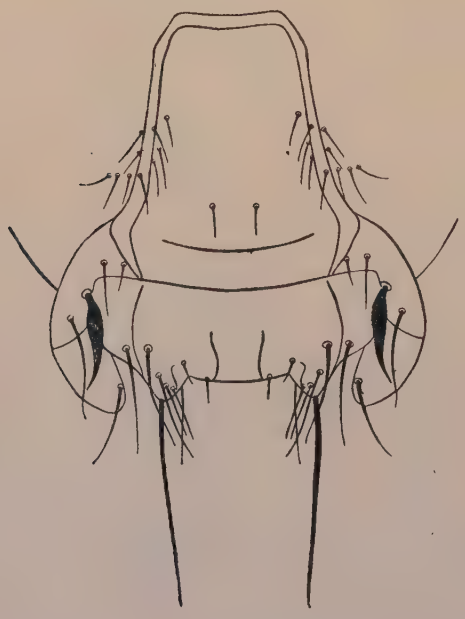
Alotipo: Lamina 1000 com um macho.

Paratipos: Laminas 996, 998, 999, 1001, 1002, e 1003 com tres femeas e cinco machos.

Todo o lote tipo pertence á nossa coleção.

Nota: Esta especie foi encontrada em material de preá colhido pelo Dr. Flavio da Fonseca, em Pedreiras, Estado de São Paulo, Brasil.

As genitalias, tanto a da femea quanto a do macho, são absolutamente caracteristicas e, por si só, bastam para determinação da especie.



5

6

Gliricola brasiliensis: 5. Genitalia da femea. 6. Genitalia do macho.

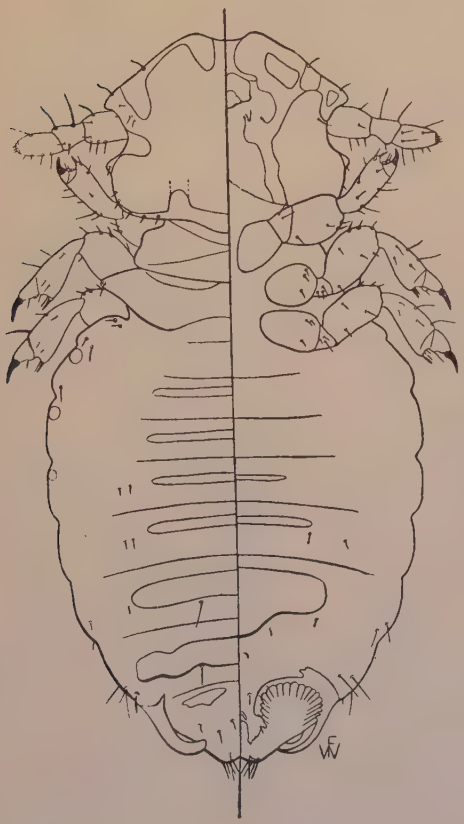
Julgamos os desenhos publicados suficientes para os fins de classificação, dispensando-nos de descrição mais minuciosa.

Trichodectes potus n. sp.

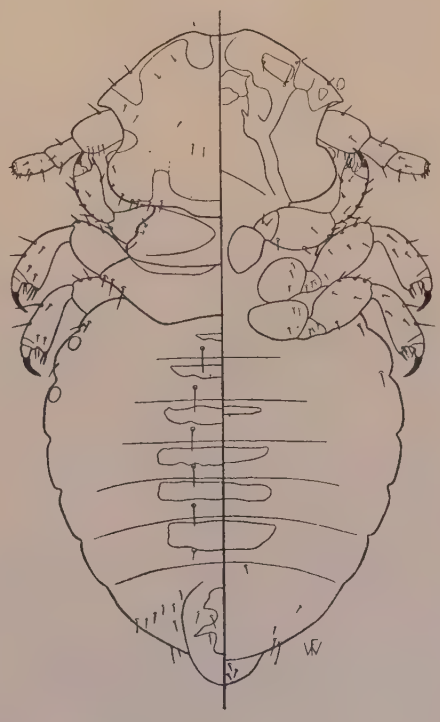
Descrição:

Femea (fig. 7). Comprimento: 1.19 mm.

Cabeça mais larga do que longa. Borda anterior arredondada, com ligeira reentrancia na linha mediana. Sinus antenal pouco profundo e pequeno, tuberculo ocular grande, temporas arredondadas e occipital pouco saliente. Na face superior encontram-se trez zonas de quitinisação mais intensa: uma ao longo da borda posterior da cabeça, com dois nodulos no ponto de inserção das fachas occipitais; outra junto ao sinus antenal; e a terceira, que se estende ao longo da margem anterior, apresenta quatro grandes nodulos, dois juntos á linha mediana e dois outros em frente ás inserções das antenas. Estes ultimos pontos são fortemente



7



8

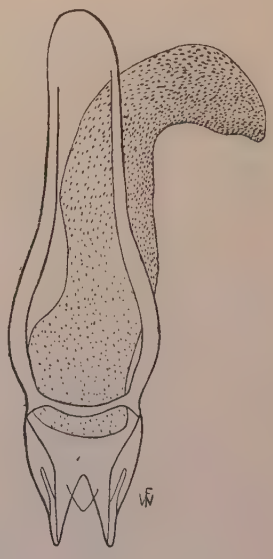
Trichodectes potus: 7. Femea, face superior e inferior. 8. Macho, face superior e inferior.

quitinisados, fazendo saliencia na superficie do tegumento. Na face inferior encontram-se as mandibulas, proximas á estremidade anterior, e espeçamentos do tegumento com o aspecto representado na fig. 7. A cabeça tem poucos pelos, notando-se apenas alguns na margem anterior, uma pequena serie nas bordas temporais e um pequeno grupo perto das antenas. Antenas com trez segmentos, dos quais o primeiro é o mais grosso e o segundo o menor, tendo o terceiro quasi o comprimento do primeiro.

Torax curto e largo. Protorax trapezoidal. Metatorax com dois angulos laterais fortemente salientes e com a borda posterior reentrante. O mesotorax é dificilmente visivel quando o insecto é examinado de cima. Membros toracicos sem nada de particular.

Abdomen ovoide, pouco mais comprido do que largo e bilobulado na estremidade posterior. Bordas laterais reentrantes ao nivel das suturas dos segmentos. Na face superior encontram-se placas pigmentadas em quasi todos os tergitos, sendo a do ultimo segmento interrompida na linha mediana; na face inferior essas placas são menos numerosas. O abdomen é quasi desprovido de pelos e tem, apenas, trez estigmas respiratorios de cada lado.

9



10

Trichodectes potus: 9. Genitalia da femea. 10. Genitalia do macho.

Genitalia representada na fig. 9.

Macho (fig. 8). Comprimento 1.14 mm.

O macho distingue-se da femea pelos caracteres seguintes:

Cabeça um pouco mais curta. Primeiro articulo antenal ligeiramente mais grosso. Abdomen mais curto, de forma oval mais pronunciada, com a estremidade posterior em ponta e com duas carreiras longitudinais de cerdas na face tergal, uma de cada lado da linha mediana. Dois estigmas respiratorios em cada margem lateral do abdomen.

Genitalia (fig. 10) formada de placa basal larga e com a estremidade distal dilatada, de parameros curtos, pontudos e como que soldados pelas estremidades anteriores e de vesicula penis grande, recoberta de pequenos espinhos.

Hospedador tipo: *Potus flavus* Schreber.

Tipo: Lamina 1011 com uma femea.

Alotipo: Lamina 1018 com um macho.

Paratipos: Laminas 1007, 1008, 1009, 1010, 1012, 1013, 1014, 1015, 1016, e 1017 com cinco femeas e cinco machos.

Todo o lote tipo pertence á nossa coleção, onde ha, ainda, grande numero de exemplares não montados e conservados em alcool na frasco n.º 76.

Nota: A especie acima foi encontrada num exemplar de *Potus flavus*, animal vulgarmente conhecido pelo nome de jupará e um dos poucos procyonideos de nossa fauna, caçado pelo Sr. Raul Avellar na Serra do Tinguá, Municipio de Nova Iguassú, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, e gentilmente determinado pelo Prof. Alipio de Miranda Ribeiro.

O numero de estigmas abdominais na especie que acabamos de descrever, constitue um caracter que a diferencia de quasi todas as outras descritas no genero *Trichodectes*, sinão de todas. Embora admitamos, por principio, um erro de observação de nossa parte, apesar do cuidado com que procedemos, não temos a menor duvida quanto ao valôr do carater que acabamos de referir, pois que se estigmas existem que tenham escapado á nossa observação, são eles forçosamente dum outro tipo muito diverso. Efetivamente, os que observamos teem grande abertura, bulbo volumoso e são tão facilmente visiveis que, á primeira vista, são notados. Os outros, se acaso existissem, seriam invisiveis pelos metodos usuais de exame. Além disso, nos preparados tratados pela potassa, corados e clareados pode-se bem ver o sistema traqueal, sem que nenhum dos seus ramos se dirija para os pontos onde deveriam ser encontrados os estigmas restantes.

Das especies descritas, talvez uma unica tenha este carater, o *Trichodectes octomaculatus* Paine, encontrado no *Procyon lotor* da America do Norte. Dizemos assim por não dispormos de material dessa especie e não termos encontrado na literatura referencia ao numero de estigmas abdominais do macho. A diferenciação das duas especies é, entretanto, facil de ser feita pela quetotaxia do abdomen.

Monothoracius n. g.

Diagnose:

Mallophaga com palpos maxilares de quatro articulos e antenas dilatadas nas extremidades distais, apresentando todos os segmentos toracicos reunidos e formando como que um só bloco. Todos os membros dum só tipo, desprovidos de unhas tarsaes. Abdomen com cinco estigmas respiratorios em cada margem.

Especie tipo: *Monothoracius penidoi.*

O novo genero acima descrito é muito proximo ao genero *Gliricola* Mjöberg, dele se diferenciando pelo numero de articulos dos palpos maxilares, pela forma geral do thorax e por apresentar todos os pares de membros iguais. Deve ser incluido na familia *Gyropidae*, da sub-ordem *Amblycera.*

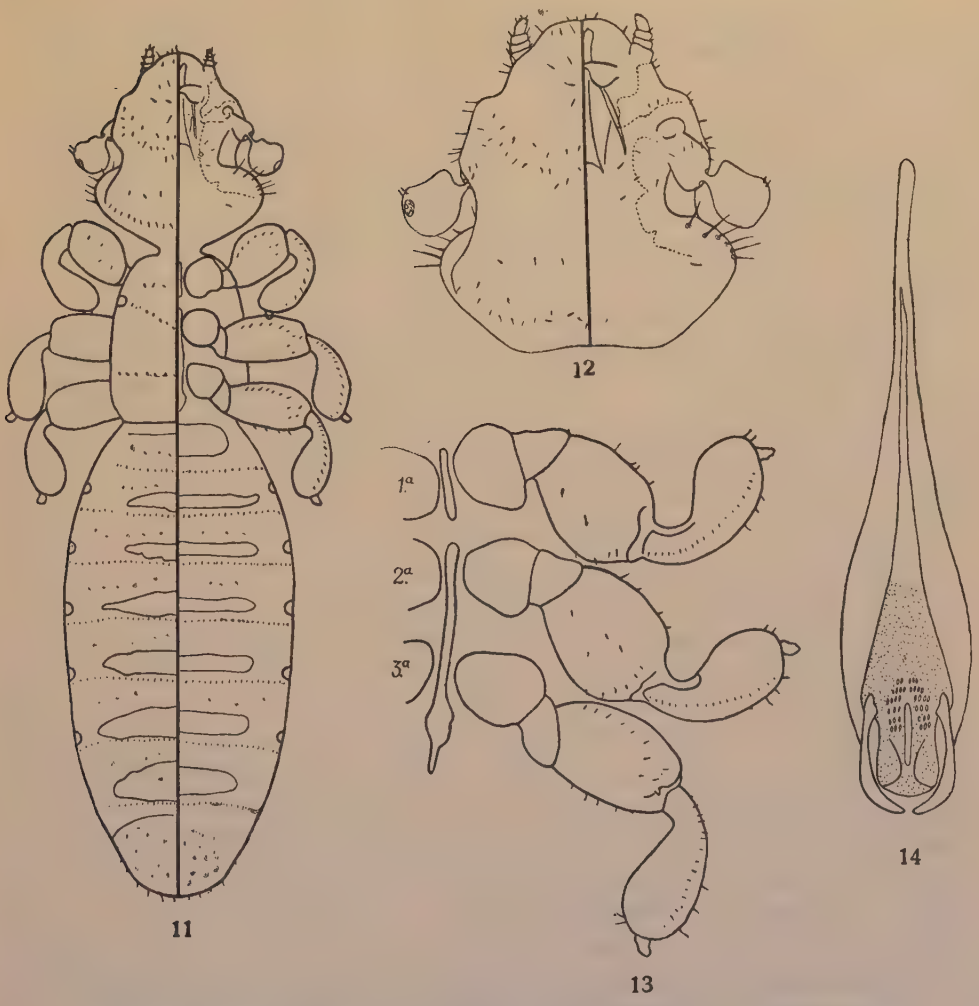
Monothoracius penidoi n. sp.

Descrição:

Macho (fig. 11). Comprimento 0.96 mm.

Cabeça (fig. 12) mais longa do que larga; arredondada na extremidade anterior. Margens laterais de contorno bastante acidentado, apresentando ligeiro lobulo ao nivel dos palpos maxilares e espandindo-se depois, bruscamente, para formar um grande lobulo préantenal. Loja antenal longa e profunda, em grande parte recoberta pela face superior da cabeça. Temporas salientes, representadas por espansões da face inferior. Palpos maxilares longos, nitidamente divididos em quatro articulos e implantados junto ás margens laterais. Tanto na periferia, como em ambas as faces da cabeça encontram-se alguns pelos pequenos, com a disposição representada na fig. 12, dos quais se destaca uma serie de seis cerdas longas implantadas na face inferior, margeiando as saliencias temporais.

Torax subcilindrico, ligeiramente mais curto e mais estreito que a



Monothoracius penidoi: 11. Macho, face superior e inferior. 12. Cabeça, face superior e inferior. 13. Membros e esternitos toracicos. 14. Genitalia.

cabeça e formado pela reunião do pro, meso e metatorax num só bloco. Na face superior ha duas carreiras de pelos curtos, delimitando possivelmente os segmentos toracicos. Na face inferior encontram-se duas placas esternais: a anterior curta, entre os quadris do primeiro par de membros, e a posterior, resultante da reunião dos esternitos meso e metatoracicos, entre os quadris dos dois pares posteriores. Todos os membros toracicos são iguais e semelhantes aos encontrados nos pares posteriores das especies do genero *Gliricola*. Entre os dois primeiros pares ha um estigma respiratorio (fig. 13).

Abdomen longo e estreito, com segmentos nitidamente separados, embora sem ondulações nas margens laterais, tendo ao longo dos bordos posteriores uma linha de pelos muito pequenos. Outros pelos identicos acham-se espalhados irregularmente pelas superficies dos tergitos e esternitos, onde se encontram tambem manchas pigmentadas, de forma irregular, alongadas e dispostas perpendicularmente ao eixo maior do abdomen. O ultimo segmento apresenta na periferia e nas faces, superior e inferior, numero maior de pelos. Os pleuritos não tem suturas visiveis, de modo que cada segmento abdominal tipico assemelha-se a um anel continuo. Os estigmas respiratorios são facilmente visiveis.

Genitalia (fig. 14) formada de placa basal muito longa, delgada na porção anterior e larga na posterior, dividida em grandes ramos terminais. Parameros curtos e recurvados. Vesicula penis recoberta de pequenos espinhos e de alguns outros maiores, dispostos em linhas transversais nas proximidades do penis.

Hospedador tipo: *Kerodon rupestris.*
Tipo: Lamina 1021 com um macho.
Paratipo: Lamina 1022 com uma forma jovem.
Ambas as laminas encontram-se em nossa coleção.

Nota:

A especie acima descrita foi encontrada em material colhido em mocó (*Kerodon rupestris* = *Kerodon moco*) caçado em Lassance, Estado de Minas Gerais, Brasil, pelo Dr. J. C. N. Penido, material este constituido por grande numero de especimens que determinamos como *Tetragyropus lineatus* (Neumann) e de dois unicos exemplares da nova especie, um macho e uma forma jovem.

Até então duas especies de Mallophaga haviam sido encontradas neste hospedador, ambas descritas como novas por Neumann. Uma delas, o *Tetragyropus lineatus*, tem sido encontrado repetidamente nos exames á que procedemos em material de mocó; nunca encontrámos, porém, a outra. Dada a extrema gentilesa do Prof. A. Martin da Escola Nacional Veterinaria de Toulouse, que teve a bondade de nos enviar para exame trez femeas e trez machos do lote tipo da *Gliricola perfoliata* (Neumann), pudemos verificar ser esta especie identica á *Gliricola porcelli* (Lin.). Não temos portanto duvida alguma quanto á validade da especie que acabamos de descrever. No caso, aliás, este exame seria desnecessario (e não o fisemos com este objectivo) pois que, embora de algum modo parecidas á observação superficial, as especies em questão tem caracteres diferenciais de tal naturesa que julgamos não ser possivel incluil-as no mesmo genero.

A classificação do Trichophyton multicolor (*)

(O. Magalhães e Aroeira Neves—1928)

pelo

DR. OCTAVIO DE MAGALHÃES

Em artigo que deve saír nos Anáis da Faculdade de Medicina de Belo Horizonte e que já está se imprimindo, fizemos uma resenha dos cogumelos produtôres de Tinha no mundo, com os respectivos artigos originais e descrevemos duas nóvas espécies, o *Trichophyton gamelleirae* e o *Microsporum paraferrugineum*. Nesse artigo nós explicámos o erro de M. Ota[1] e seus colaboradores, que pretenderam colocar o *T. multicolor* como sinonimo de *E. rubrum* (Castellani, 1909). Os autôres repétem o mesmo erro em outro artigo recentemente publicado[2]. Eles acham que *Sabouraudites rubrum* — var. *alba* = *Epidermophyton lanoroseum* — Mac. Carthy 1925 = *T. rubidum* = Pristley 1927 = *T. rubrum* — Castellani 1909 = *T. purpureum* = Bang. 1910 = (?) *T. multicolor* — Magalhães e Neves = *Epidermophyton plurizoniforme* — Mac. Carthy 1928 = *T.* «*B*» de Hodges 1927 = *T. purpureum* var. I de Takahashi 1925 = *T. B.* Ota 1922 = *T. lileum* Kawasaki 1923 = *T. purpureum* var. II Takahashi = *T. cocineum* — Kato 1926. Salvo o *T. multicolor* e *E. rubrum* não conhecemos sinão pelas descrições as outras espécies, não podendo, por isso, ter delas uma noção exáta. As culturas do *T. multicolor* e do *E. rubrum* parecem-se tanto como a de um *Achorion* e a de um *Microsporum*!

Os autôres japonêses, com mais um pouco, reduziam todos os produtôres de tinhas a uma unica e mesma espécie... Talvez fosse melhor assim... Quanto ao *T. multicolor* ainda bem que os autôres, após a igualdade, estamparam uma interrogação. Fizeram muito bem. A unica respósta que deviamos dar aos autôres é que, antes de descrever

(*) Recebido para publicação a 14 de Dezembro de 1933.

1 1930 — T. Hashimoto, T. Irizawa, M. Ota. — Une variété blanche du *"Sabouraudites ruber"* Ota e Langeron — 1923 — (*Epidermophyton rubrum*, Castellani, 1909 — Japan Journal of derm. aurol, t. XXX, n. 3, 1930).

2 1933 — M. Ota et Sch. Kawatsuré. — Sur le *Sabouraudites ruber* et ses varietés. Ann. de Parasitologie, tome XI, n. 6, 1 Novembre 1933.

o novo fungo, tivemos em mãos 9 casos clinicos, com culturas positivas, de *Epidermophyton rubrum* (Castellani 1909) . . . Aliás não precisámos saír do Brasil para encontrarmos bons trabalhos sobre *Epidermophyton rubrum* (Castellani 1909). Quem quiser aprofundar o assunto basta procurar e lêr o esplendido trabalho do esforçado pesquizador paulista Dr. Abilio Martins de Castro, de 1927. Si quiséssemos ainda mais alguns dados anotariamos as culturas *em meio de conservação de Sabouraud* — apigmentadas no *rubrum* e pigmentadas no *multicolor*. Uma, a do *multicolor*, é sêca, pulverulenta, cerebrifórme. Outra, a do *rubrum*, é penugenta, lisa ou ligeiramente pulverulenta e sulcada, no fim da vida.

Mas já que estamos com a mão na massa vale a pena esclarecer a questão. É tão brutal a diferença das culturas macroscopicas entre o *Trichophyton multicolor* e o *Epidermophyton rubrum* que pelas estampas apenas, só por isso, é possivel a separação. Vamos por partes. Os autôres apégam-se á questão do pigmento para dividir as culturas em 2 grupos: 1) culturas coradaas de um modo difúso em vermelho com ou sem anéis purpuricos; 2) Culturas brancas ou vermelho palido. Temos a impressão que foi só a questão do pigmento que levou os autôres a incluir no grupo do *E. rubrum* o *T. multicolor* . . . Desse módo para ele deveriam entrar tambem o *Sabouraudites felineum*, o *Sabouraudites lanosum*, o *Sabouraudites audouini*, o *Sabouraudites equineum*, o *Trichophyton violaceum*, o *Trichophyton conicum*, o *Trichophyton ferrugineum*, o *Trichophyton rosaceum*, etc. que todos apresentam óra num óra noutro meio, óra um óra todos os matizes do *Epidermophyton rubrum*. Mesmo assim vemos que o *T. multicolor* jamais apresenta o *vermelho purpureo*, que caracteriza o *rubrum*, em qualquér dos meios empregados.

Mas o erro fundamental dos autôres japonêses é ligar importancia decisiva ao pigmento de culturas macroscópicas dos cogumêlos das Tinhas. Ora, onde ele absolutamente não deve servir para diagnostico diferencial marcado é justamente no *E. rubrum*. Das 9 raças que estudámos nem uma só conservou o pigmento «rubro», nem uma só se apresentou com os matizes classicos descritos pelos autôres. O que era vermelho tournou-se branco, o que era branco — vermelho.

Pela idéa dos autôres japonêses, os que tinham *fusos*, por serem vermelhas, deviam perdê-los por se terem transformado em brancas! Basta esta transformação para mostrar como é precaria a variedade «*alba*» de Ota e seus colaboradores. Quanto á sistematica ainda ha para respingar. Para Grigoraki o *Epiderm. rubrum* seria um *Closteroaleuros-*

poria. Para Langeron e Ota, 1923, seria um *Sabouraudites*. Para Langeron e Milochevitch 1930, seria um *Trichophyton*. Não sabemos si essas constantes modificações nas classicas divisões de Sabouraud têm realmente trazido alguma vantagem ao conhecimento dos fungos produtôres das Tinhas. Vuillemin, por exemplo, pensa que as divisões mixtas, clinicas e parasitologicas de Sabouraud, devem ser conservadas. Não seremos nós que discordaremos de Vuillemin. Seguindo a classificação de Sabouraud tinhamos que discutir a afirmativa de Ota, em a qual este pesquizador assegurou ter obtido infestação de pêlos pelo *Epiderm. rubrum*. Até hoje, ao que nos conste, só ele o conseguiu. Mac Carthy, Castellani, Langeron, Martins de Castro, Aroeira Neves não o obtiveram. O proprio Bang teve duvida sobre casos que ele diz ter obtido de infestação positiva. Por isso, ele classificou o *E. rubrum* como um *Trichophyton ectóthrix megasporo* — «jusqu'a plus ample informé». Para Ota o *E. rubrum* é um «*endothrix*», puro no homem. Langeron e Ota, 1923, acham que o *E. rubrum* tem como orgãos diferenciados — aleurias e fusos. Ota, Irizawa e Hashimoto, em principios de 1930, acham que o *E. rubrum* apresenta: aleurias em cachos simples ou compostos e fusos e jamais espirais, sendo um endóthrix. Para Ota e outros, 1933, tem mais ainda orgãos nodulares e orgãos pectineos.

Em Outubro de 1930, Langeron e Milochevitch pensam que o «*rubrum*» como os demais epidermophytons, deve ficar num grupo especial de Trichophytons «*que n'attaquent pas les poils et restent localisés à la peau glabre et l'épiderme*». O *Trichophyton rubrum*, segundo Langeron, daria *hifas* esporíferas longas, (tipo Acladium), com esporos bacilifórmes. Langeron não obteve fusos. Para Sabouraud e seus discipulos o *Epidermophyton rubrum*, como os demais epidermophytons, diferencia-se pela ausencia de ataques aos pêlos, pela presença de fusos especiais e tírsos esporíferos simples ou compostos. Como vemos, as idéas e fátos de Ota nem são universalmente aceitos. A cousa é de tal ordem que se fica na duvida si Ota trabalhou sempre com o mesmo cogumêlo.

O *Trichophyton multicolor* apresenta, em culturas:

a) — Fusos numerosos e dos tipos *Sabouraudites* e *Ctenomyces*;
b) — Clamydosporos terminais e intercalados; alguns com tumefações de crescimento;
c) — Cachos simples e compostos;
d) — Esboços de orgãos pectineos;
e) — Espirais frouxas;
j) — Orgãos fusifórmes;
g) — Não apresenta orgãos nodulares.

É, como vemos, um parasito rico de orgãos diferenciados. Mesmo que aceitassemos as idéas de Ota, fariamos a seguinte diferenciação na propria classificação — Langeron e Ota, 1923:

Epidermophyton rubrum — Sabouraudites;
Trichophyton multicolor — Trichophyton;
Epidermophyton rubrum — Sabouraudites de colonias penugentas, lísas ou lévemente sulcadas, de côr vermelho rubro, « megasporo », [endothrix (?)], não infesta (maioria dos autores) os pêlos ou dificilmente infesta os pêlos (Ota). Dificilmente infesta cobaias.
Trichophyton multicolor — Trichophyton de colonias pulverulentas, sêcas, cerebriformes, de origem humana, multicolorido, « microide », endo-ectóthrix. Facilmente infesta cobaias e os pêlos.

Será preciso mais? Queremos acentuar bem que nós, como a maioria dos autôres, não aceitamos as idéas de Ota nem sobre a sistematica geral dos fungos produtôres de Tinhas e muito menos sobre a biologia do *Epidermophyton rubrum*, até mais amplos infórmes.

Estudo comparativo das inclusões do alastrim e da vacina no macaco (Macacus rhesus) (*)

pelos

DRS. C. MAGARINOS TORRES e J. DE CASTRO TEIXEIRA

(Com as estampas XXVIII – XXXI)

O alastrim, tambem denominado *amaas*, *Kaffir-milkpox*, *whitepox*, *mild smallpox*, *paravariola*, *parasmallpox*, *variola minor*, *variola mitigada* é uma doença infecciosa eruptiva especifica semelhando a variola, sendo na opinião de alguns (LESCHKE, McSWEENEY) uma fórma mitigada dessa doença, e na de outros (GARROW), molestia diversa, embora proxima daquela.

As informações encontradas na literatura a respeito das inclusões do alastrim são escassas, sendo que a sua propria existencia é materia controversa (v. RICARDO JORGE).

Embora a transmissão experimental do alastrim ao macaco seja relatada por varios pesquizadores e diversas especies [1] usadas nessas experiencias, nenhumas informações existem nesses trabalhos sobre a histologia das lesões experimentais conseguidas, sendo as primeiras a respeito desse assunto as que publicámos em 1933.

Semelhanças ou diferenças que fossem achadas entre os corpusculos de Guarnieri da variola e as inclusões do alastrim constituiriam dado importante para a questão das relações entre variola e alastrim.

Seria interessante explorar a questão sob esse ponto de vista, levando em conta que as inclusões das doenças de virus são consideradas como alterações celulares delicadas e altamente especificas.

E' necessario, comtudo, levar em conta que elas apresentam consideravel variação em sua estrutura quando examinadas em tecidos e em animais diferentes. Assim as inclusões intranucleares da febre amarela, encontradas no cerebro de macacos injetados com a amostra do virus da febre amarela adaptada ao camondongo, são por vezes semelhantes,

(*) Recebido para publicação a 5 de Dezembro de 1933.

1 "Rhesus and bonnet monkeys" (Green 1915); M. rhesus (Leake and Force 1923); M. rhesus (Braxall 1923); "un Atele, Koata ou Koaita du Brèsil" (Baujean 1925); "diverses spèces et variétés de cercopithèques" (Van Hoof 1925), "Macacus cynomolgus" (Leake and Force 1927).

mas, quasi sempre diferentes das inclusões típicas nas celulas hepaticas (GOODPASTURE).

Temos em vista, no presente trabalho, realizar um estudo comparativo da infecção experimental produzida em macacos *rhesus* pelo virus do alastrim e da vacina. Uma atenção particular mereceu a morfologia das inclusões citoplasmaticas especificas estudadas comparativamente nos animais inoculados de um lado com alastrim e de outro com vacina. Os corpusculos do alastrim foram encontrados, por vezes em grande abundancia, em biopsias de lesões cutaneas provenientes de 12 macacos *rhesus* diferentes e os corpusculos da vacina em lesões cutaneas de 3 outros macacos rhesus. Nestes ultimos foram conseguidas vesiculas e pustulas após injeção endovenosa de pôlpa vacinica recentemente preparada (pôlpa bruta).

O material empregado na transmissão experimental do alastrim provem de 3 doentes observados em uma pequena epidemia que ocorreu, em 1932, na cidade do Rio de Janeiro, de 4 outros durante uma epimia, em 1933, no Estado de Minas Geraes, e de um outro, durante outra epidemia de alastrim no Estado do Rio de Janeiro, em 1933.

As condições indispensaveis para ser realizado um estudo comparativo entre as inclusões das doenças de virus foram aparentemente preenchidas visto como foram elas examinadas em animais da mesma especie e no mesmo tecido submetido aos mesmos artefactos de técnica: fixação no liquido de Helly, inclusão em parafina e coloração pela hematoxilina-eosina.

O presente trabalho aproveita material proveniente dos seguintes macacos:

Rhesus — 1469. O conteúdo de uma vesicula e duas pustulas de um doente de alastrim no 8.º dia de molestia (J. P. S., Hospital Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro) foi retirado por meio de três pipetas capilares estéreis e transportado, antes de secar, para um tubo de ensaio contendo 1,5 cc. de agua fisiologica estéril. O liquido turvo assim obtido foi injetado por via endovenosa, alguns minutos após, no macaco 1469, não sendo praticada nenhuma escarificação prévia. O animal apresenta elevação de temperatura no 5.º dia e uma erupção no 6.º dia de inoculação. A erupção se inicia sob a fórma de pequenas vesiculas disseminadas sobre a face, extremidades inferiores, tronco e abdomen. As vesiculas logo se transformam em pustulas, devendo-se notar que o estadio de papula é geralmente difícil de reconhecer no macaco. Novas vesiculas aparecem, ainda, durante os dois dias seguintes. Foram retiradas por biopsia lesões da pele ao nivel do tronco (n.º 3602), no 7.º dia, e ao nivel do ante-braço (n.º 3618) e da coxa (n.º 3619), no 9.º dia. As condições gerais foram sempre bôas, o animal sobrevivendo.

Rhesus — 1474. O conteúdo de diversas pustulas do rhesus 1469 no 7.º dia de inoculação foi colhido por meio de pipetas capilares e emulsionado em cerca de 1 cc. de agua fisiologica. O liquido turvo assim obtido foi injetado por via endovenosa, alguns minutos após, no rhesus 1474, nenhuma escarificação tendo sido praticada na ocasião. O animal apresenta febre (41.º C.) no 4.º dia de inoculação e uma erupção no 8.º. Vesiculas de tamanho variavel, algumas volumosas, outras hemorragicas, mas todas

sem umbelicação, aparecem na palma das mãos, sola dos pés e nas pernas. Fotografias dessas lesões foram já publicadas em uma nota anterior (v. C. R. Soc. Biol., 1933, pag. 917). Diversas biopsias de lesões cutaneas foram praticadas no 10.º e 12.º dias ao nivel da face interna da perna esquerda (n.º 3632), pé direito (n.º 3638) e ante-braço (n.º 3639). O animal sobreviveu, permanecendo em bôas condicões.

Rhesus — 1484. Injetado por via endovenosa, tal como foi descrito na inoculação anterior, com o conteúdo de diversas pustulas do animal precedente (rhesus 1474) colhido no 10.º dia de inoculação. Apresenta uma elevação de temperatura (39,5º C.) no 5.º e uma erupção no 7.º dias, a qual é mais acentuada nas extremidades do que na face e tronco. Nos três dias imediatos aparecem novas vesiculas que logo transformam-se em pustulas. Diversas biopsias foram praticadas no 8.º e 9.º dias ao nivel da coxa esquerda (n.º 3663), da perna esquerda junto ao tornozelo e de ambos os pés (n.ºs 3654 e 3665). O animal sobrevive.

Rhesus — 1465. O conteúdo de varias pustulas de um caso de alastrim (P. S., Hospital S. Francisco de Assis, Rio de Janeiro) retirado com pipetas capilares esterilisadas foi emulsionado em agua fisiologica. Algumas horas depois, o material foi depositado na região interorbitaria do rhesus 1465 e nessa ocasião ahi praticadas com um bisturí diversas escoriações. Quatro dias após, a região se apresenta congesta e edemaciada, notando-se duas pequenas vesiculas sobre as escarificações, as quais foram submetidas á biopsia (n.º 3593). O animal apresenta a temperatura de 39,5º C. no 6.º dia de inoculação, sobrevivendo e permanecendo depois em bôas condições.

Rhesus — 1492. Uma emulsão preparada com o conteúdo de diversas vesiculas e pustulas de um caso de alastrim (J. J. J., Hospital Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro), no 9.º dia de molestia foi injetado por via endovenosa no rhesus n.º 1492. O animal apresenta elevação de temperatura (39,6º C.) no 6.º dia de inoculação, e uma erupção sob a forma de pequenas vesiculas sobre o pavilhão da orelha e outras, poucas, sobre o tronco. A erupção foi discreta e o exame histologigo de uma lesão retirada no 9.º dia mostra a estrutura de uma pustula em dissecação. Não foram encontradas inclusões citoplasmaticas.

Rhesus — 1577. Injetado por via endovenosa, a 13 de Julho de 1933, com uma emulsão em agua fisiologica do conteúdo de pustulas de um caso de alastrim. O material foi retirado a 9 de Julho de 1933 em Caratinga, Estado de Minas Gerais, pelo Dr. Jairo Lobo Martins, ao qual agradecemos a gentileza de sua colaboração. O animal apresenta febre e uma erupção vesiculosa no 6.º dia de inoculação. Foram retiradas por biopsia duas vesiculas da perna (n.os 3904 e 3905) O animal sobrevive.

Rhesus — 1593. Injetado por via endovenosa a 9 de Agosto de 1933 com 2 cc. de uma emulsão em agua fisiologica preparada com o conteúdo de pustulas de um caso de alastrim. O material foi colhido a 3 de Agosto de 1933 pelo Dr. Jairo Lobo Martins, em Caratinga, Estado de Minas Gerais. O macaco apresenta temperatura de 39.º C. no 5.º dia de inoculação e uma erupção vesiculosa predominante ao nivel dos membros inferiores no 6.º dia. O animal sobrevive.

Rhesus — 1597. Recebeu por via endovenosa, a 12 de Setembro de 1933, 2 cc. de uma emulsão em agua fisiologica preparada com o conteúdo de diversas pustulas conservado em glycerina, de um caso de alastrim (G. P). O material foi colhido a 1 de Setembro de 1933, no Estado de Minas Gerais e obtido por gentileza do Dr. Ernani Agricola, diretor de Saúde Publica Estadual. Nessa ocasião foram praticadas escoriações no dorso do animal cujos pêlos foram arancados. O macaco apresentou a temperatura de 39,8º C. no 5.º dia, a qual elevou-se a 40,1º no 6.º. No 4.º dia foram notadas diversas pustulas, mas nenhuma vesicula, na região escarificada do dorso. No 6.º dia surgem numerosas vesiculas nas extremidadas, especialmente nos pés, e ainda nas extremidades superiores, bem como algumas raras, na face. Foram retiradas diversas vesiculas para estudo microscopico, três (nos. 3983-85) no 6.º e outras

(n.º 3998) no 9.º dia de inoculação. As vesiculas achavam-se em franca dissecação no 17.º dia. O animal sobrevive, conservando-se em bôa saúde.

Rhesus — 1605. Inoculado por via endovenosa com material retirado do macaco precedente (rhesus 1597) no 7.º dia de inoculação. Consta ele de duas vesiculas recentemente excisadas e maceradas em agua fisiologica. O animal mostra elevação de temperatura (39,8º C.) no 5.º dia. A febre persiste durante três dias, notando-se no 6.º dia o aparecimento de diversas pustulas e vesiculas nas extremidades inferiores, outras, raras, na face e tronco. Novas vesiculas surgem no 7.º dia sobre as pernas e pés. As lesões são assaz numerosas nos ante-braços e muito evidentes depois que os pêlos foram aparados com tesoura. Foram praticadas duas biosias (n.ºs 4017 e 4018). O animal sobrevive.

Rhesus — 1615. Inoculado por via endovenosa com material retirado do macaco precedente (rhesus 1605) no 8.º dia de inoculação. Consta de diversas pustulas recentemente excisadas e maceradas em agua fisiologica. O animal apresenta elevação de temperatura (39,8º C.) no 5.º dia, caindo esta a 38,5º C. no 9.º dia. A erupção aparece no 6.º dia, sendo mais abundante nos membros inferiores, como em geral acontece. Novas vesiculas surgem no 7.º e 8.º dias. Foram retiradas vesiculas para estudo microscopico (n.ºs 4035, 4051, e 4052). O animal sobrevive.

Rhesus — 1602. Foi injetado por via intravenosa em 12 de Setembro de 1933 com 3 cc. de uma emulsão em agua fisiologica do conteúdo de pustulas misturado com glicerina e material seco conservado em pipetas capilares, provenientes de um caso de alastrim (J. M.) ocorrido no Estado de Minas Gerais. O material foi devido á gentileza do Dr. Ernani Agricola. O macaco apresenta a temperatura de 39,8º C. no 4.º dia, subindo ela a 40,4º C. no 7.º, caindo a 38,7º C. no 9.º e permanecendo em tôrno de 38.3º C. nos dias imediatos. O animal sobrevive. A erupção se inicia no 6.º dia, sendo encontradas no 7.º numerosas vesiculas, notadamente nas extremidades inferiores. No 8.º dia, numerosas vesiculas aparecem nos ante-braços e algumas na face. A dissecação das lesões era acentuada no 12.º dia. Foram retiradas duas vesiculas da coxa (n.ºs 3994 e 3995), no 8.º dia, para estudo histologico.

Rhesus — 4060. Injetado por via endovenosa com uma emulsão em agua fisiologica preparada com o conteúdo de pustulas de um caso de alastrim no 10.º dia de molestia. O doente foi trazido de Itaperuna, Estado do Rio de Janeiro, onde grassava, então, uma epidemia de alastrim, para o Hospital Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Foi isso possivel graças á gentileza do Dr. Americo Oberlaender, Diretor da Saúde Publica Estadual. O animal apresenta febre no 6.º dia de inoculação, a qual periste nos 3 dias imediatos, surgindo uma erupção vesicular no 6.º dia. Foi retirada uma vesicula para estudo histologico. O animal sobrevive.

Rhesus — 1629. Inoculado por via endovenosa com material retirado do macaco precedente (rhesus 4060), apresenta uma temperatura de 40.1º no 4.º dia. A febre persiste durante 3 dias, aparecendo no 5.º dia de inoculação algumas papulas nas extremidades inferiores e face. No 6.º dia, as vesiculas são numerosas na face, pavilhão do orelha e extremidades inferiores. Novas vesiculas surgem no 7.º dia. Foram praticadas duas biopsias, uma (n.º 4076) no 8.º, e outra (n.º 4079) no 10.º dia de inoculação. O material consta de seis pequenas pustulas recentemente excisadas e maceradas em agua fisiologica. O animal sobrevive.

Rhesus — 1556. Foi injetado por via endovenosa com vacina (pôlpa bruta) recentemente obtida em vitelo emulsionada em agua fisiologica. O material foi obtido por gentileza do Dr. Paulo Affonso Franco, Chefe do Serviço Vacinogenico do Instituto Oswaldo Cruz. Diversas papulas e vesiculas que se transformam em pustulas aparecem no 5.º dia, outras surgindo no 8.º. Algumas, posteriormente, se ulceram. Foram praticadas diversas biopsias (n.ºs 3791-94) no 6.º dia. O estado geral do animal agrava-se progressivamente, achando-se êle moribundo no 12.º dia de inoculação. Foi então morto pelo cloroformio e necropsiado imediatamente depois.

Rhesus — 1559. Foi inoculado por via endovenosa com o conteudo de diversas pustulas do rhesus 1556. A temperatura eleva-se no 4.º dia de inoculação, quando surge uma erupção sobre o tronco e extremidades inferiores. Diversas vesiculas e pustulas foram excisadas no 5,º dia (n.º 3802). O animal apresenta-se muito prostado e doente, morrendo no 12.º dia de inoculação.

Rhesus — 1571. Recebeu por via intravenosa, 5 cc. de uma suspensão de pôlpa vacinica em agua fisiologica. O material foi o mesmo injetado no macaco precedente (rhesus 1556), tendo porém sido guardado durante 85 dias na geladeira. O animal apresenta febre e uma erupção no 5.º dia. Surgem novas vesiculas no 6.º e 7.º dias, diversas lesões sendo então retiradas para estudo histologico (n.ºs 3855-3866). O animal apresenta signaes de doença durante treze dias, mas afinal sobrevive, conservando-se em bôas condições de saúde:

Rhesus — 1570. Injetado por via endovenosa com o conteúdo de 5 tubos capilares contendo linfa vacinica e destinados ao mercado. O animal nada apresenta, conservando-se sempre em bom estado de saúde.

ALTERAÇÕES CITOLOGICAS NO ALASTRIM

As modificações citologicas investigadas dizem respeito, especialmente, ás lesões citoplasmaticas produzidas em celulas do *stratum germinativum* da epiderme. Semelham elas, de um modo geral, os corpusculos de Guarnieri da vacina e da variola.

Embora existam, tambem, alterações nucleares (fig. 22), são elas discretas e serão posteriormente discutidas.

Em alguns casos, embora nenhuma inclusão seja visivel, nota-se material basofilo adossado á membrana nuclear (Figs. 4 e 10), bem como aspecto vacuolado do citoplasma. Outras vezes, sem que nenhuma inclusão apareça, o citoplasma da celula epidermica apresenta, em zona limitada, uma coloração azul pela hematoxilina. Os limites entre tal zona basofila e o citoplasma normal acidofilo circunvizinho não são nitidos, notando-se contudo, que a estrutura reticular do citoplasma é perfeitamente conservada em tais areas basofilas (figs. 5, 6 e 33).

As estampas XXVIII e XXIX, figs. 1-23, representam inclusões do alastrim vistas em material fixado no Zenker, incluido em parafina e corado pela hematoxilina-eosina. Apresentam-se sob a fórma de massas irregulares, tintas em azul escuro ou azul violeta, as quais, tal como as inclusões da vacina, podem se alojar em uma depressão do nucleo (figs. 1 e 2). Algumas delas, fortemente coradas, circundam o nucleo de maneira peculiar, semelhando um gôrro (figs. 7, 8 e 34), mas não determinando depresões na superficie do nucleo. Tambem elas não se fusionam com a membrana nuclear (fig. 34).

As inclusões do alastrim são muito polimorfas, ora triangulares (figs. 19 e 27), ora em forma de crescente (figs. 9, 20 e 38), ora em forma de raquete (fig. 17). Muitas se apresentam disseminadas no citoplasma (figs. 1 e 11), ocupando, ás vezes, polos opostos do nucleo (fig.

14). Quando volumosas, elas geralmente se apresentam isoladas e solitarias (figs. 35-40). Em tais fases adiantadas, tambem, o citoplasma mostra grandes areas de aparente vacuolisação (figs. 36, 39 e 40).

A reação basofilla das inclusões do alastrim é patente mesmo naquelas cujo volume é igual ao do nucleo (fig. 9). Em uma celula foram achadas, lado a lado, duas inclusões, uma basofila, outra acidofila (fig. 16). A Fig. 21 representa uma celula epidermica necrosada, mostrando o nucleo em picnose e o citoplasma fortemente corado pela eosina. A inclusão se apresenta com o aspecto de uma massa redonda roseo-violacea situada em zona do citoplasma aparentemente destituida de estrutura. E' possivel que a reação acidofila do corpusculo do alastrim, em tal elemento, esteja ligada ás alterações de necrose.

Pelo que ficou dito, resulta, pois, que os caracteres principais das inclusões do alastrim encontradas em celulas epidermicas do *Macacus rhesus* são a sua reação basofila e a sua ocorrencia como inclusão isolada ou solitaria quando em fase adiantada de evolução.

Algumas vezes os nucleos de celulas contendo inclusões do alastrim apresentam estrutura normal (Figs. 3, 13, 34, 35, 36 e 37). Outras vezes, apresentam-se eles tumidos (Figs. 9, 10, 12 e 17) ou deformados (Figs. 16, 19, 20 e 35).

Não foram encontradas inclusões intranucleares semelhantes ás representadas por COUNCILMANN, MAGRATH e BRINCKERHOFF em sua Estampa IX, Figuras 5, 7, 8 e 9. Em algumas celulas, porém, as alterações nucleares não correspondem exatamente ás descritas sob os termos de picnose, cariorrhexis e cariolisis. A figura 22 mostra uma de tais celulas na qual o material acidofilo, marginado por cromatina basofila, aparece no nucleoplasma, aspecto tal que sugere, até certo ponto, a degenerescencia oxicromatica.

As inclusões apresentam notavel uniformidade de aspecto em suas fases adiantadas, embora diversas amostras do virus tivessem sido usadas. Não foram notadas variações individuais no aspecto das inclusões, o que bem se pode vêr comparando as figuras 10-16 obtidas no rhesus 1465 injetado com a amostra P. L. com as figuras 4-9, rhesus 1469, e as Figuras 17-23, rhesus 1474, ambos injetados com a amostra J. P. S.. Tais amostras provém de casos de alastrim colhidos em uma epidemia ocorrida no ano de 1932, na cidade do Rio de Janeiro.

Inclusões sob todo o ponto de vista semelhantes ás precedentes, foram posteriormente observadas no rhesus 1579 e rhesus 1605, injetados com a amostra G. P. e no rhesus 1605, amostra J. M., ambas oriundas de outra epidemia de alastrim em lugar diferente (epidemia de 1933 no Estado de Minas Gerais). O mesmo aconteceu com as in-

clusões vistas nos rhesus 1577 e 1593 inoculados com a amostra de Caratinga (Estado de Minas Gerais), e com os rhesus 4060 e 1629 injetados com a amostra L., de Itaperuna, Estado do Rio de Janeiro.

Contudo, como era de esperar, embora diversos aspectos ocorram, conjuntamente, em um mesmo material, alguns dêles aparecem com mais frequencia do que outros. Depende isso em parte, certamente, do estadio evolutivo da lesão. Assim, inclusões do alastrim de pequenas dimensões eram facilmente encontradas no rhesus 1484 (Figs. 1, 2 e 3), enquanto estadios adiantados (Figs. 19, 20 e 21) eram assaz comuns no rhesus 1474 e as inclusões em forma de gôrro (Figs. 7 e 8) no rhesus 1469; no entanto, todos esses animais foram injetados com a mesma amostra do virus (amostra J. P. S.).

Geralmente as inclusões do alastrim são mais abundantes nas fases iniciais das lesões cutaneas, especialmente no estadio de papula epidermica. A' medida que progride a supuração, vão elas se tornando cada vez mais escassas. Contudo não é raro encontrar inclusões do alastrim e algumas de grandes dimensões, em celulas epidermicas situadas nas paredes de uma pustula. Não foram elas mais encontradas em uma pustula examinada no periodo de seca.

No presente trabalho não serão examinadas as alterações acaso produzidas pelo virus do alastrim no condrioma e aparelho de Golgi. Todas as descrições são baseadas em preparações coradas pela hematoxilina-eosina. Esse metodo simples, de uso geral em trabalhos histologicos, não apresenta nenhum tempo caprichoso em sua execução. As preparações por ele conseguidas, prestam-se melhor a um estudo comparativo do que outras obtidas com metodos, sem duvida, mais desejaveis, tais os de Biondi-Heidenhain e de Giemsa.

Nitido aspecto heterogeneo das inclusões do alastrim póde ser reconhecido mesmo em preparados pela hematoxilina-eosina. Algumas delas mostram pequenas areas esfericas (Figs. 9, 14, 15 e 38) que não tomam nenhuma substancia corante e se conservam claras (vacuolos não corados). Outras mostram uma estrutura reticular tipica (Fig. 20), parecendo que se continuam insensivelmente com o citoplasma adjacente (Figs. 14, 18, 37 e 38), provavelmente uma falsa impressão atribuivel aos atificios da técnica empregada.

Grandes espaços claros, sem estrutura aparente, são frequentemente observados no citoplasma das celulas epidermicas que contém inclusões, quando usada a luz natural, uma objectiva de imersão de 2 mm. e a ocular compensadora 6 de Zeiss (Fig. 21), sendo o diafragma-iris e o condensador manobrados de modo a aproveitar o maximo de luz. Quando porém, são mudadas essas condições de observação, e se emprega uma

lampada de arco, a objectiva de imersão de 2 mm. e a ocular 25 de Leitz, verifica-se a existencia de um reticulo em tais espaços claros aparentemente sem estructura (Fig. 23). Esse reticulo muito se assemelha, pelas dimensões de suas malhas, ao verificado em celulas epidermicas normais adjacentes, dele diferindo apenas por não se corar pela eosina e não ser visivel quando usada iluminação intensa, Algumas vezes ele se mostra levemente tinto pela hematoxilina. As figuras 29 e 40 tambem representam a mesma celula reproduzida nas figuras 21 e 23. Na figura 40 o diafragma foi parcialmente fechado e nela se vê um reticulo ocupando porções do citoplasma que coincidem com os vacuolos vistos na mesma celula (Fig. 39) quando usado o maximo de luz.

Um reticulo semelhante foi egualmente encontrado no citoplasma aparentemente vacuolado que circunda as inclusões do alastrim, nas celulas representadas nas figuras 13, 15 e 19.

Por vezes um filamento ou membrana acidofilos (Figs. 9, 16, 19, 21, 38 e 40) separa de modo nitido essas zonas claras de citoplasma onde se alojam as inclusões, do citoplasma adjacente onde a estrutura normal é preservada.

ALTERAÇÕES CITOPLASMATICAS NA VACINA

As figuras 24, 25, 41 e 42 representam inclusões da vacina com dimensões semelhantes ao nucleolo da celula epidermica em que são observadas. Circumnucleares em algumas celulas (Figs. 24 e 25), elas aparecem disseminadas no citoplasma em outras celulas (Figs. 41 e 42), outras vezes sendo isoladas (Fig. 24), ainda outras dispostas em polos opostos do nucleo (Figs. 25 e 42).

A sua coloração é uniforme nos preparados pela hematoxilina-eosina. Algumas (Figs. 25, 26 e 28) se tingem em tonalidades que vão do violeta-acinzentado ao azul escuro (reação basofila), ao passo que outras (Figs. 24 e 27) coram-se em roseo avermelhado (reação acidofila).

Algumas inclusões da vacina mostram em seu interior pequenos espaços claros ou vacuolos descorados (fig. 28), ao passo que em outras é bem aparente uma estrutura reticulada (Fig. 42).

As figuras 29, 30, 31, 32, 43 e 44 ilustram inclusões da vacina como o aspecto de massas irregulares ou de granulos grossos ou finos difundidos no citoplasma. Algumas atingem tamanho relativamente grande. Quando numerosas, elas se alojam em uma area clara do citoplasma bem separada do citoplasma adjacente por um filamento ou membrana (Figs. 31, 32 e 41).

As inclusões da vacina contidas em uma mesma celula não se coram com a mesma tonalidade. Enquanto umas se apresentam de côr cinzenta-violacea, outras mostram nitida coloração rosea. Essa variabilidade nas reações de coloração das inclusões da vacina, em uma mesma celula epidermica, são um detalhe que chama a atenção no material de macacos injetados com o virus da vacina, tal a frequencia e a regularidade com que aparece.

O nucleo pode apresentar estrutura aparentemente normal em celulas que contém numerosos corpusculos da vacina (fig. 29). Quasi sempre, porém, os nucleos mostram-se tumidos (figs. 25, 26 e 27) ou deformados (figs. 30, 31 e 32).

DISCUSSÃO

Ao descrever aspectos diversos nas alterações citoplasmaticas do alastrim e da vacina não foi nossa tenção afirmar que elas representam estadios evolutivos diversos de uma mesma lesão. Naturalmente isso poderá ser o caso em algumas delas. Não se deve, porém, excluir a suposição de que eles representem, desde o inicio, graus diferentes em que foi atingida a celula pelo virus respectivo. Não é necessario, assim, que uma inclusão de grandes dimensões, suponhamos maior que o nucleo, haja forçosamente passado pela fase de inclusão de pequenas dimensões, digamos do tomanho do nucleolo. E' possivel, mesmo que inclusões de pequenas dimensões não prosigam em sua suposta evolução, e conservem tais dimensões. Representarão, nesse caso, a fase final de alterações especificas que os virus do alastrim ou da vacina ocasionaram na celula considerada.

A primeira impressão que se tem ao fazer o estudo comparativo das inclusões celulares especificas do alastrim e da vacina nas lesões cutaneas do macaco rhesus é a de grande variabilidade, explicavel, naturalmente, pela ocorrencia de fases evolutivas diferentes na formação das inclusões e pela extensão maior ou menor que podem ter, em cada celula, as lesões especificas produzidas pelos virus.

Quando de pequenas dimensões e discretas, as inclusões citoplasmaticas são muito semelhantes em ambos os virus, conforme se vê comparando a fig. 11 que representa duas pequenas inclusões do alastrim situadas em polos opostos do nucleo, com as inclusões da vacina ilustradas na figura 25.

Exame mais atento revela, contudo, diferenças entre as inclusões do alastrim e as da vacina, embora sejam elas delicadas e ligeiras. Dizem elas respeito ao numero das inclusões presentes em cada celula e á sua coloração.

As inclusões do alastrim são ordinariamente solitarias (Figs. 2, 3, 8, 12, 13, 15, 17, 19 e 20) mesmo nos estadios em que apresentam o mesmo volume ou são maiores que o nucleo da celula onde ocorrem (Figs. 9 e 20). Quando de dimensões pequenas, podem elas, no entanto, ser em numero de 2-4, constituindo, muitas vezes, corpusculos paranucleares ou circumnucleares (figs. 1, 7 e 11).

Se existe, como atraz foi mencionado, uma semelhança entre as inclusões do alastrim e as da vacina de dimensões pequenas, uma diferença nitida aparece quando são comparadas entre si inclusões de maiores dimensões. Com efeito, ao passo que as inclusões do alastrim, nesse aspecto, se conservam unicas ou solitarias no citoplasma das celulas epidermicas do macaco rhesus, as da vacina são sempre numerosas ou multiplas em tais estadios onde existe extenso aspecto vacuolado do protoplasma. Parece que esse aspecto não é excepcional em estadios evolutivos adeantados dos corpusculos da vacina e não depende do tecido, nem do animal empregado. Com efeito, figuras mostrando inclusões da vacina numerosas, grandes e irregulares, são representadas no trabalho de GOODPASTURE, WOODRUFF e BUDDINGH (Fig. 1, Estampa 42), em celulas epiteliais do ectoderma da membrana corio-alantoidiana do embrião de galinha, e no de HUECKEL (Figuras 93 e 113, Estampa III), em celulas da cornea do coelho.

A outra diferença diz respeito ás reações de coloração. As inclusões do alastrim coram-se, de modo regular, em azul escuro, quando de pequenas dimensões (Figs. 1, 7, 8 e 12) e em cinzento-azulado quando maiores e do tamanho do nucleo (Figs. 9 e 20). As da vacina mostram uma tonalidade de coloração muito caprichosa. Mesmo quando de pequenas dimensões, e do tamanho do nucleolo elas se apresentam, ora nitidamente coradas em roseo pela eosina (Fig. 24) ora, o que é mais comum, em azul (Figs. 25, 26 e 28). A esse respeito porém, a feição mais caracteristica das inclusões da vacina é a coexistencia, no citoplasma de uma mesma celula, de inclusões coradas umas em azul, outras em roseo (Figs. 29-32).

Tendo notado a frequencia com que tais inclusões policromatofilas eram achadas nas lesões experimentais da vacina no macaco rhesus, resolvemos procura-las, de modo sistematico, nas lesões do alastrim. O resultado foi encontrarmos a celula representada na Fig. 16, na qual aparecem duas inclusões em forma de crescente, uma corada em azul, outra em roseo. Foi esse, aliás, o unico exemplo ilustrando a policromatofilia das inclusões do alastrim e a raridade do fato forma grande contraste com o que acontece nas inclusões da vacina.

RESUMO

1 — Vesiculas e pustulas contendo numerosas inclusões citoplasmicas nas celulas epidermicas, foram regularmente produzidas no macaco (*Macacus rhesus*), quer com o virus do alastrim, quer com o da vacina, após inoculação endovenosa e sem previa escarificação. O virus do alastrim parece menos virulento para essa especie de macaco que o da vacina. Ao passo que 12 macacos rhesus injetados por via endovenosa com sete amostras diferentes de virus do alastrim, após apresentarem com regularidade uma infecção experimental, sobreviveram e se conservaram em boa saúde, a injecção endovenosa do virus da vacina recentemente preparado (pôlpa bruta) produziu a morte em 2, dentre 4 animais experimentados.

2. — Foram notadas diferenças pequenas, mas nitidas, na morfologia das inclusões do alastrim e da vacina, em material fixado no liquido de Helly, incluido em parafina e corado pela hematoxilina-eosina. Dizem elas respeito ao numero de inclusões encontradas em cada celula epidermica e ás suas reações de coloração.

3. — As inclusões do alastrim, quando apresentam grandes dimensões, conservam-se unicas ou solitarias no citoplasma das celulas epidermicas do macaco rhesus, e coram-se em tonalidade que varia do azul escuro ao cinzento-azulado. Comtudo, em celulas que sofreram necrose, ou naquelas contendo 2 a 4 inclusões de pequenas dimensões, por vezes elas se mostram coradas em roseo.

4. — As inclusões da vacina, quando em faze adeantada de desenvolvimento, são multiplas nas celulas epidermicas do macaco rhesus e mostram, regularmente, uma policromatofilia caracteristica.

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS XXVIII — XXXI

As figuras 1 a 23 e 33 a 40 representam celulas epidermicas de *Macacus rhesus* com as inclusões do alastrim.

As figuras 24 a 32 e 41 a 44 ilustram celulas epidermicas de *Macacus rhesus* com as inclusões da vacina.

Todas essas celulas são encontradas em lesões cutaneas (vesiculas e pustulas) experimentalmente produzidas no macaco.

As figuras 1 a 22 e 24 a 32 foram desenhadas na altura da mesa com a ocular compensadora 6 de Zeiss e objetiva de imersão homogenea 1/12×100 ZEISS. A figura 23 foi desenhada na altura da mesa com a Ocular 25 ZEISS e objetiva de imersão homogenea 1/12×100 ZEISS.

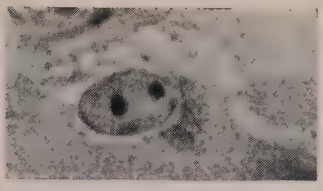
As figuras 33 a 44 são microfotografias feitas com o augmento de 1.150 diametros.

Figuras	1	a	3	—	Celulas	epidermicas	do	rhesus	—	1484	(n.º 3663).
Figuras	4	a	9	—	Celulas	epidermicas	do	rhesus	—	1469	(n.º 3602).
Figuras	10	a	16	—	Celulas	epidermicas	do	rhesus	—	1465	(n.º 3593).
Figuras	17	a	23	—	Celulas	epidermicas	do	rhesus	—	1474	(n.º 3632).
Figura			24	—	Celula	epidermica	do	rhesus	—	1571	(n.º 3860).
Figuras	25	a	32	—	Celulas	epidermicas	do	rhesus	—	1556	(n.º 3791).
Figuras	33	a	40	—	Celulas	epidermicas	do	rhesus	—	1474	(n.º 3632).
Figuras	41	a	44	—	Celulas	epidermicas	do	rhesus	—	1556	(n.º 3791).

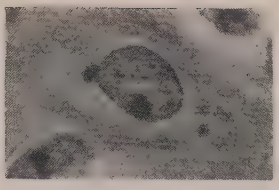
A. Leal, del.

Drs. Torres e Teixeira : Estudo comparativo das inclusões do alastrim e da vacina no macaco (*Macacus rhesus*).
A comparison of the inclusion bodies of alastrim and vaccinia in the monkey (*Macacus rhesus*).

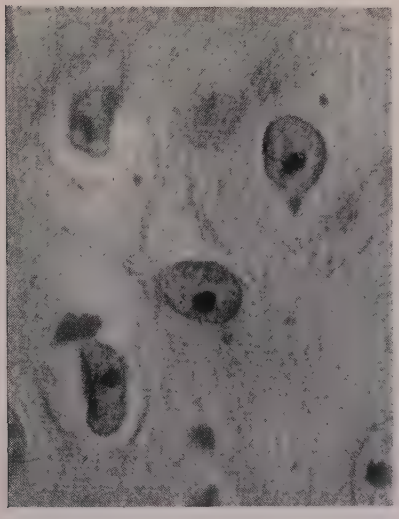
Drs. Torres e Teixeira : Estudo comparativo das inclusões do alastrim e da vacina no macaco (*Macacus rhesus*).
A comparison of the inclusion bodies of alastrim and vaccinia in the monkey (*Macacus rhesus*).



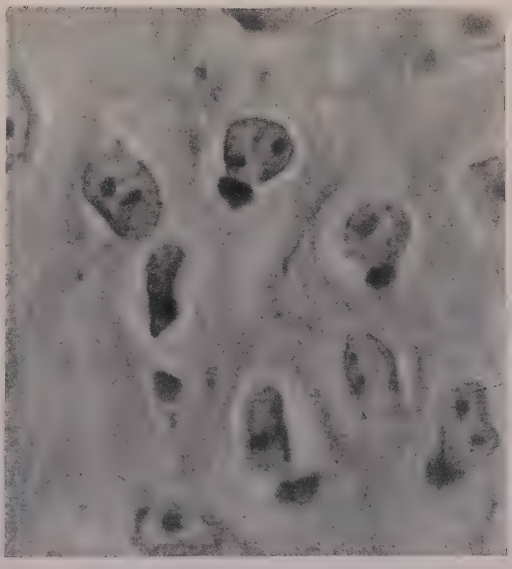
33



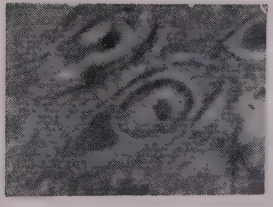
34



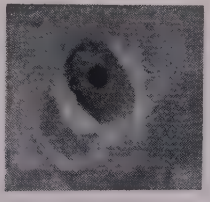
35



36



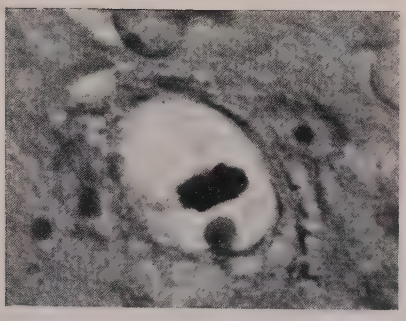
37



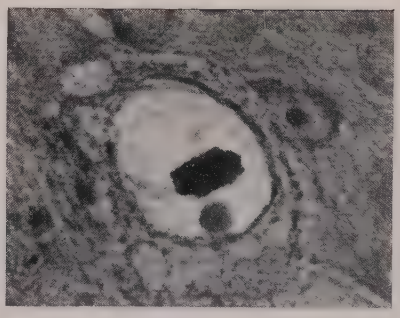
38

Fotomicro de J. PINTO

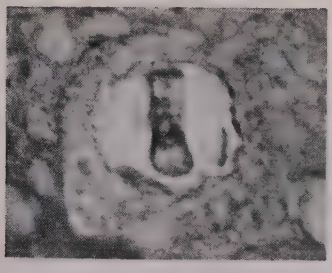
Drs. Torres e Teixeira : Estudo comparativo das inclusões do alastrim e da vacina no macaco (*Macacus rhesus*).
A comparison of the inclusion bodies of alastrim and vaccinia in the monkey (*Macacus rhesus*).



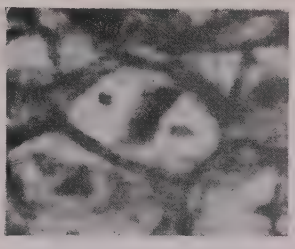
39



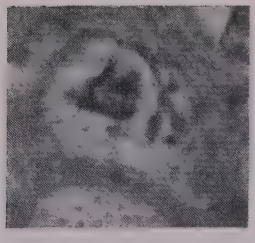
40



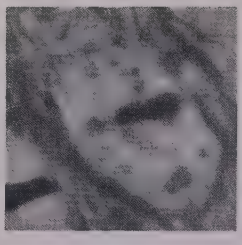
41



42



43



44

Fotomicro de J. PINTO

Drs. Torres e Teixeira : Estudo comparativo das inclusões do alastrim e da vacina no macaco (*Macacus rhesus*).
A comparison of the inclusion bodies of alastrim and vaccinia in the monkey (*Macacus rhesus*).

A comparison of the inclusion bodies of alastrim and vaccinia in the monkey (Macacus rhesus) (*)

by

C. MAGARINOS TORRES, M. D. and J. DE CASTRO TEIXEIRA, M. D.

(Plates XXVIII—XXXI)

Alastrim, called also amaas, Kaffir-milkpox, whitepox, mild smallpox, paravariola, parasmallpox, *variola minor*, *variola mitigata* is a specific contagious eruptive fever resembling smallpox, a mitigated form of that disease in the opinion of some (LESCHKE, McSWEENEY), a quite different disease closely related to it in that of others (GARROW).

Not many observations have been reported concerning the inclusion bodies of alastrim. In fact their mere existence is a matter of dispute (see RICARDO JORGE).

While a successfull inoculation of the disease to the monkey is stated by several authors and different species[1] were tried, no microscopic examination of the experimental lesions has been published previous to our own reports in 1933.

If it should be shown that similarities or differences are found between the Guarnieri bodies of variola and the inclusion bodies of alastrim important data would be supplied concerning the identity of variola and alastrim. This is a fascinating line of work, as inclusion bodies correspond to rather delicate and highly specific cellular changes.

Considerable variation in their structure, however, do occur specially when different animals and tissues are compared. Yellow fever intranuclear inclusions, for instance, as seen in the brains of encephalitic monkeys inoculated with the mouse strain of yellow fever virus are sometimes similar, but more often different from typical intranuclear inclusions as they appear in liver cells (GOODPASTURE).

The object of this paper is to study by comparison the experimental infection of rhesus monkeys with the viruses of alastrim and

---

(*) Received for publication December 5, 1933.

1 "Rhesus and bonnet monkeys" (Green 1915); *M. rhesus* (Leake and Force 1923); *M. rhesus* (Blaxall 1923); "un Atele, Koata ou Koaita du Brèsil" (Baujean 1925); "diverses spèces et veriétés de cercopithèques" (Van Hoof 1925); *"Macacus cynomolgus"* (Leake and Force 1927).

of vaccina. A great stress was put into the morphology of the inclusion bodies as they appear in epidermal cells of the experimental vesicles and pustules. Cytoplasmic inclusion bodies of alastrim were examined in specimens from 12 experimentally infected rhesus monkeys and vaccine bodies in specimens from three other rhesus monkeys. In the latter vesicles and pustules were induced after intravenous inoculation of recently prepared bovine vaccine emulsion. Alastrim material was derived from 3 patients during a small outbreak of the disease in 1932 at Rio de Janeiro City, from 4 patients during an outbreak in 1933 at Estado de Minas Gerais, and from one patient during another outbreak at Estado do Rio de Janeiro in 1933.

The requirements for a comparison between inclusion bodies were apparently fulfilled as they were examined in the same animal and tissue, and as the specimens were submitted to the same artefacts: fixation in Helly's fluid, embedding in paraffin, and staining with alum hematoxylin and eosin.

This report is based upon material from the following monkeys:

Rhesus — 1469. The content of one vesicle and of two pustules from J. P. S., a patient of alastrim (Hospital Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro City) on the eighth day of disease was sucked up by means of three sterile capillary pipettes, and drawn up before driing into a tube containing approximately 1.5 cubic centimeter of sterile physiologic sodium chlorid solution. The turbid suspension was injected intravenously to rhesus 1469 a few minutes latter no scarification being performed. The monkey presents a rise of temperature after five days and an eruption after six days. The first sign of the eruption was in the form of small separated vesicles upon the forehead, lower extremities, trunk and abdomen. These vesicles soon become pustular, the stage of papule being rather difficult to recognise in the monkey. During the next day or two more vesicles appear. Pieces of skin were excised from the trunk (n.º 3602) on the seventh day, and from the forearm (n.º 3618) and hip (n.º 3619) on the ninth. The general condition remained always good and the animal recovered.

Rhesus — 1474. The content of several pustules from rhesus 1469 on the seventh day of inoculation was collected in capillary pipettes and added to about 1 c. cm. of salt solution. The turbid emulsion was injected a few minutes latter to rhesus 1474 no scarification being performed. The animal developed fever (41.º C.) on the fifth day after inoculation and an eruption on the eight day. Quite large sometimes hemorrhagic vesicles without any definite umbelication appear over the palms of the hands, soles of the feet and legs. Pictures from such skin lesions were given in a previous report (see C. R. Soc. Biol., 1933, pg. 917). Several pieces of skin were excised on the tenth and on the twelfth days from the internal aspect of the left leg (n.º 3632), right foot (n.º 3638), and right forearm (n.º 3639). The animal finally recovered and remained well.

Rhesus — 1484. Injected intravenously as described in the previous experiment with the content of several pustules from the above mentioned animal (rhesus 1474) on the twelfth day of inoculation developed a temperature of 39.5º C. on the fifth day after inoculation and an eruption on the seventh, more profuse upon the extremities rather than the face and the trunk. New vesicles which soon become pustular appear during the next three days. Several pieces of skin were excised on the eight and on the ninth day from the left hip (n.º 3663), left leg near the ankle, and left and right feet (n.ºs 3664 and 3665). The animal recovered and remained well.

Rhesus — 1465. The content of several pustules from a patient of alastrim (P. L., Hospital S. Francisco de Assis, Rio de Janeiro City) was withdrawn with several fine pipettes and a suspension in saline solution prepared. A few hours latter this material was transferred to the interorbital region of rhesus 1465 while many scarifications were made by means of a scalpel. Reddening and edema of the region appear four days latter, two small vesicles being then apparent over the scarifications and excised for microscopic examination (n.º 3593). The animal developed a temperature of 39,5º C. on the sixth day after inoculation and finally recovered and remained well.

Rhesus — 1492. A saline suspension prepared with the content of several vesicles and pustules from J. J. J., a patient of alastrim on the ninth day of disease (Hospital Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro City) was injected intravenously to rhesus 1492. The animal developed a temperature of 39,6º C. on the sixth day after inoculation and an eruption appears in the form of a small vesicle over the external ear and a few more over the trunk but it remains quite discrete. The microscopic examination from a specimen excised on the ninth day shows the structure of a pustule in dessication. No inclusion bodies were detected and the material was discarded.

Rhesus — 1577. Injected intravenously on July 13, 1933 with an emulsion in saline solution of pustule contents from a patient of alastrim secured on July 9, 1933 by Doctor Jairo Lobo Martins at Caratinga, Estado de Minas Gerais, developed fever and a vesicular eruption on the sixth day after inoculation. Two vesicles from the leg were excised for microscopic study (n.ºs 3904 and 3905). The animal recovered and remained well.

Rhesus — 1593. Inoculated intravenously on August 9, 1933 with 2 c. cm. of an emulsion in saline solution of pustule contents from a patient of alastrim secured on August 3, 1933 by Doctor Jairo Lobo Martins at Caratinga, Estado de Minas Gerais, developed a temperature of 39.º C. on the fifth day after inoculation and a vesicular eruption predominant upon the lower extremities on the sixth day. The animal did not succum.

Rhesus — 1597. Was injected intravenously on September 12, 1933 with 2 c. cm. of an emulsion in physiologic salt solution of pustule contents mixed with glycerine secured on September 1, 1933 at Estado de Minas Gerais from G. P., a patient of alastrim. The material was obtained through the courtesy of Doctor Ernani Agricola, Director de Saúde Publica Estadual. At the same time the skin was scraped upon the back. The animal developed a temperature of 39.8º C. on the fifth day and reached 40,1º C. on the sixth day. On the fourth day several subcutaneous papules but no vesicles were seen at the area in which the skin have been previously scraped. On the sixth day numerous vesicles appear upon the lower extremities, and quite a few upon the forehead. Several vesicles were excised for microscopic examination, three (n.ºs 3983-85) on the sixth and others (n.º 3998) on the eight day after inoculation. On the seventieth day dessication was advanced producing crusts which loosen readily. The animal finally recovered and remained well.

Rhesus — 1605. Subinoculated intravenously from the above mentioned animal (rhesus 1597) developed a temperature of 39.8º C. on the fifth day. This continued for three days, and on the sixth several pustules and vesicles appear upon the lower extremities, and quite a few upon the forehead and trunk. On the seventh day new vesicles appear upon the legs and feet. The vesicles and pustules are numerous upon the forearms and better apreciated after the hairs were cut short. Two biopsies (n.ºs 4017 and 4018) were performed. The animal did not succum. The material was derived from two vesicles recently excised from rhesus 1597 on the seventh day after inoculation and soaked in physiologic salt solution.

Rhesus — 1615. Subinoculated intravenously from the above mentioned animal (rhesus 1605) developed a temperature of 39.8º C. on the fifth day. The temperature falls to 38.5º C. on the ninth

day and the animal recovered. The rash appears on the sixth day, and the lesions are more numerous upon the lower extremities as usual. New vesicles appear on the seventh and on the eight days. Three vesicles were excised for microscopical study (n.os 4035, 4051 and 4052). The material was derived from several pustules recently excised from rhesus 1605 on the eight day after inoculation and soaked in physiologic salt solution.

Rhesus — 1602. Was injected intravenously on September 12, 1933 with 3 c. cm. of an emulsion in physiologic salt solution of pustule contents mixed with glycerine and also dried in capillary pipettes secured on September 1, 1933 at Estado de Minas Gerais from J. M., a patient of alastrim. The material was available through the courtesy of Doctor Ernani Agricola. On the fourth day developed a temperature of 39.8° C. and reached 40.4° C. on the seventh, falling to 38.7° C. on the ninth and remaining around 38.3° C. on the following days. The animal did not succum. The rash appears on the sixth day, numerous vesicles being found on the seventh specially upon the lower extremities. On the eighth day numerous vesicles were seen upon the forearms, and quite a few upon the hands. On the twelvieth day dessication was advanced producing crusts. On the eighth day after inoculation two vesicles upon the hip were excised for microscopic study (n.os 3994 and 3995).

Rhesus — 4060. Injected intravenously with an emulsion in saline solution of pustule contents from L., a patient of alastrim on the tenth day of disease, developed fever on the sixth day after inoculation. This continued for three days and a vesicular eruption appears on the sixth day. A vesicle was excised for micoscopic examination (n.° 4060). The animal recovered and remained well. The patient was brought to Hospital Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro City, from Itaperuna, Estado do Rio de Janeiro, where an outbreak of alastrim was prevalent at the time.

Rhesus — 1629. Subinoculated intravenously from the above mentioned animal (rhesus 4060) developed a temperature of 40.1° C. on the fourth day. Fever continued for three days and on the fifth a few papules appear upon the lower extremities and forehead. On the sixth day numerous vesicles are seen upon the forehead, external ear and lower extremities. New ones appear on the seventh day. Two biopsies were performed, one (n.° 4076) on the eighth and another (n.° 4079) on the tenth day after inoculation. The material was derived from six small pustules recently excised from rhesus 4060 on the eight day after inoculation and soaked in physiologic salt solution. The animal recovered.

Rhesus — 1556. Was injected intravenously with standard bovine vaccine pulp recently prepared and developed a temperature of 39.4° C. on the fourth day after inoculation. This continued for two days and reached 40° C. on the sixth day. Several papules and vesicles which latter become pustular appear on the fifth day and new ones on the eight day after inoculation. Some of them ulcerate. Specimens from the skin were excised on the sixth day after inoculation (n.° 3791-94). The general condition of the animal becomes progressively worse and it was found moribund on the twelfth day after inoculation. A few drops of chloroform were administered and the necropsy was performed immediately.

Rhesus — 1559. Was subinoculated intravenously with the content of several pustules from rhesus 1556. The temperature rises five days after the inoculation when an eruption appear over the trunk and lower extremities. Several vesicles and pustules were excised on the fifth day (n.° 3802). The animal appears very ill and prostrated and died twelve days after inoculation.

Rhesus — 1571: Received intravenously 5 c. cm. of a suspension in physiologic salt solution of vaccinia pulp. The material was the same injected into rhesus 1556 as previously reported but it was placed in cold storage during 85 days. The monkey developed fever and an eruption appear on the sixth and seventh day of inoculation. New vesicles appear on the sixth and seventh days when specimens from the skin were excised for examination (n.os 3855-3860). The animal showed signs of illness for thirteen days, but it finally recovered and remained well.

Rhesus — 1570. Was injected intravenously with the content of five vaccine emulsion capillary tubes ready for the market. The animal showed no reaction and remained well.

CYTOLOGICAL CHANGES IN ALASTRIM

The cytological appearances investigated comprise chiefly cytoplasmic changes as they appear in cells from the *stratum germinativum* of the epidermis. They resemble in a general way the Guarnieri bodies of variola and vaccinia.

Nuclear changes while present (Fig. 22) were rather scanty and will be discussed latter.

In some cases, while no inclusion bodies are seen, there may be basophilic material attached to the nuclear membrane (Figs. 4 and 10) and vacuolation of the surrounding cytoplasm. In other cases, while no definite inclusion body is yet visible, the cytoplasm of the epidermal cell assumes in a limited extent a blue stain with hematoxylin; the boundaries between such basophilic and normal acidophilic cytoplasm are not clear and the reticular structure remarkably well preserved in the basophilic areas (Figs. 5, 6 and 33).

Alastrim bodies as they appear after fixation in Helly's fluid and staining with hematoxylin and eosin are illustrated in Plates XXXVIII and XXIX, Figs. 1-23. They may be seen as irregular deep blue to bluish-violet masses which occasionally indent the nuclei (Figs. 1 and 2). Sometimes the deeply stained bodies surround the nuclei in a peculiar way resembling a small cap or coif (Figs. 7, 8 and 34) although not indenting the nucleus. They do not fuse likewise with the nuclear membrane (Fig. 34).

Alastrim bodies are very polymorphic, triangular (Figs. 19 and 37), crescent-shaped (Figs. 9, 20 and 38) or racket-like (Fig. 17). Most of them are scattered in the cytoplasm (Figs. 1 and 11), sometimes near two opposite ends of the nucleus (Fig. 14). As a rule they are single when rather voluminous (Figs. 35-40). Such advanced stages are associated with larger areas of unstained cytoplasm (Figs. 36, 39 and 40).

The basophilic reaction in sections colored by hematoxylin and eosin can be seen even in such alastrim bodies which are as large as the nucleus (Fig. 9). In one case represented in Figure 16, one basophilic and one acidophilic body were found side by side in the same cell. Such appearances were, however, very rare.

Finally, Figure 21 illustrates a necrotic cell of the *rete Malpighi* in which the cytoplasm is deeply stained by the eosin and the nucleus is pycnotic. The inclusion body appears as a pinkish violet rounded mass in an apparently structureless cytoplasm. It is open to question if the

marked acidophilic reaction of the alastrim body is not here dependent upon non-specific necrotic changes.

From the foregoing description it is evident that the chief characteristics of the alastrim bodies which appear in cells of the stratum mucosum of *Silenus rhesus* are their basophilic reaction and their occurrence as a single body in latter stages.

In some cases the nuclei of cells provided with alastrim inclusions present a normal structure (Figs. 3, 13, 34, 35, 36 and 37). In other cases they are swollen (Figs. 9, 10, 12 and 17) or shrunken (Figs. 16, 19, 20 and 35). Intranuclear inclusions as they are illustrated by COUNCILMANN, MAGRATH and BRINCKERHOFF in their Plate IX, Figures 5 7, 8 and 9 were not found. In a few cells, however, the nuclear changes could not be properly described as pycnosis, karyorrhexis or karyolysis. Figure 22 shows one of those cells in which acidophilic material appears in the nucleoplasm and is enclosed by marginated basophilic chromatin, an appearance which suggests to some extent oxychromatic degeneration.

Advanced stages of cytoplasmic inclusions reveal a striking similarity although several strains of the virus of alastrim were at work. No individual variation was equally noticed as it may be seen when Figures 10-16 from rhesus 1465 injected with strain P. L. are compared with Figures 4-9 from rhesus 1469 and Figures 17-23 from rhesus 1474 both injected with strain J. P. S. Those strains were derived from cases during an outbreak of alastrim in 1932 at Rio de Janeiro City. Alastrim bodies indistinguishable from those above refered to were also found in rhesus 1579 and rhesus 1605, strain G, P. and in rhesus 1602, strain J. M., both strains derived from patients during another outbreak of the disease in a different place (outbreak of 1933 at Estado de Minas Gerais) as well as in rhesus 1577 and 1593, strain from Caratinga, and rhesus 4060 and 1629, strain from Itaperuna, Estado do Rio de Janeiro.

As one would expect, however, while several stages were usually found in every block some of them appeared quite numerous. This depends obviously from the stage of the lesion. Small alastrim bodies for example, were easily found in rhesus 1484 (Figs. 1, 2 and 3) while advanced stages (Figs. 19, 20 and 21) were quite common in rhesus 1474 and cap-shaped bodies (Figs. 7 and 8) in rhesus 1469; all the animals were injected, however, with the same strain of the virus (strain J. P. S.).

As a rule, alastrim bodies are more numerous in early lesions of the skin, namely in the stage of epidermic papule. They become less

and less numerous while suppuration advances. Large alastrim bodies, however, are not rare in epidermal cells from the walls of a pustule. They could no more be demonstrated in a desiccated pustule.

No attempt is made in this paper to examine the changes produced in mitochondria an in the Golgi apparatus by the virus of alastrim. Alum hematoxylin and eosin stained sections have been made the basis of the work. This stain so used for general histological work presents no difficult point and the results are very regular. Biondi-Heidenhain and Giemsa's methods should be more desirable. But the proper combination in Biondi-Heidenhain staining solution and the differentiation step in Giemsa's method certainly increase the difficulty in obtaining perfectly comparable stained preparations.

Definite heterogeinity of the alastrim bodies may be evidenced even in hematoxylin and eosin stained preparations. Some of them show very small spherical areas (Figs. 9, 14, 15 and 38) which do not take any stain but appear clear resembling unstained vacuoles. Other inclusions show a definite reticular structure (Fig. 20) and seem to grade into the cytoplasm (Figs. 14, 18, 37 and 38), probably a false impression due to the methods of fixation and staining.

In fixed preparations clear-looking structureless spaces are very conspicuous in the cytoplasm of epidermal cells provided with inclusions (Fig. 21) when sunlight is used and the sections are examined with a 2 mm. oil-immersion objective, Zeiss compensating ocular 6, the iris diaphragm and the Abbé condenser properly focussed so as best to illuminate the preparation. Nevertheless, when optical conditions are changed, a feltwork will come to light in these clear spaces. Figure 23 shows the cell represented in Figure 21 as seen when an arc lamp and a 2 mm. immersion objective and Leitz ocular 25 are used. The whole net resembles the one existing in the cytoplasm of normal epidermal cells except for their lack of staining with eosin. It appears sometimes poorly stained with hematoxylin. Figures 39 and 40 represent also the same cell reproduced in Figures 21 and 23. In Figure 40 the light was partially shut off by the iris diaphragm and a network can be distingished in parts of this cell corresponding to clear-looking spaces more readily than in Figure 39. A framework similar in appearance was found also in the vacuolated cytoplasm near alastrim bodies in the cells represented in Figures 13, 15 and 19.

In some cells provided with inclusions an acidophilic filament or membrane is a very conspicuous structure demarcating the clear-looking spaces in the cytoplasm (Figs. 9, 16, 19, 21, 38 and 40).

CYTOLOGICAL CHANGES IN VACCINIA

Vaccine bodies of about the same size as the nucleolus are represented in Figures 24, 25, 41 and 42. Circumnuclear in some cells (Figs. 24 and 25), they may spread throughout the cytoplasm in others (Figs. 41 and 42), being either single (Fig. 24) or multiple and in some cases related to opposite ends of the nucleus (Figs. 25 and 42).

Their staining is not consistent in hematoxylin and eosin stained preparations. Some of them (Figs. 25, 26 and 28) are tinged in grayish-violet to deep blue (basophilic reaction), others (Figs. 24 and 27) a purplish-red to pink (acidophilic reaction).

Small clear spaces or unstained vacuoles may be seen in some of the vaccine inclusions (Fig. 28), while in others a reticular structure is apparent (Fig. 42).

Irregular vaccine bodies diffusely distributed through the cytoplasm are illustrated in Figures 29, 30, 31, 32, 43 and 44. Some of them reach a relatively large size. They occur in irregular clumps and masses scattered through the cytoplasm and sometimes in fine and coarse granules. When numerous they lie in a clear area often well demarcated from the adjoining cytoplasm by a wavy pink stained filament or membrane (Figs. 31, 32 and 41).

Vaccine bodies do not stain alike within the same cell. While some of them are stained a grayish-violet, others present a definite pink color. This variation in their staining within one cell was a prominent feature of the specific cellular inclusions of vaccinia in epidermal cells of the rhesus monkey.

The structure of the nucleus may be normal in epithelial cells bearing numerous vaccine bodies (Fig. 29). In most cases, however, the nuclei are swollen (Figs. 25, 26 and 27) or shrunken (Figs. 30, 31 and 32).

DISCUSSION

Describing several appearances in cytoplasmic changes in alastrim and vaccinia it may not be inferred that they necessarily correspond to gradual transitions of those structures. Naturally this is the case with some of them. But it must be asked whether similar appearances should not correspond to different degrees in which the injured cells react to the virus. In this case and notwithstanding their occasional relative small size they really may correspond to a final stage of specific changes being the only effect which can be induced by the virus in the cell.

The first impression one gets from a study of specific cellular inclusions in alastrim and vaccinia as they appear in skin lesions of rhesus monkeys is their extreme variation obviously dependent on intermediate stages in the formation of inclusions or related do different degrees of cell injury in response to the virus.

However, when small and discrete, they look very similar in both diseases as may be seen if Figure 11 representing two small alastrim bodies at the opposite ends of the nucleus is compared to vaccine bodies illustrated in Figure 25.

Nevertheless, on closer examination, definite although slight and delicate differences may be noticed between alastrim and vaccine bodies. They are chiefly related to the number of inclusion bodies within the cell and to their staining.

Alastrim bodies are usually single (Figs. 2, 3, 8, 9, 12, 13, 15, 17, 18, 19 and 20) even in such advanced stages in which they have the approximate size or are even larger than the nucleus of the epithelial cell (Figs. 9 and 20). In early stages, however, two and sometimes three ou four small paranuclear or circumnuclear bodies may be found (Figs. 1, 7 and 11).

If there is a resemblance between early stages of alastrim and vaccine bodies, as previously stated, a striking difference is to be noted when advanced stages are compared. In fact, while alastrim bodies in late stages occur singly, vaccine bodies are regularly numerous within the epithelial cells of monkeys (Figsı 29-32) in advanced stages leading to extensive vacuolation of the cytoplasm. It seems that this appearance is not unusual with advanced stages of vaccine bodies whatever may be the tissue or the animal examined because illustrations showing numerous large irregular vaccine bodies within epithelial cells of ectoderm of the chick embryo are given by GOODPASTURE, WOODRUFF and BUDDINGH in their Figure 1, Plate 42, and within corneal cells of the rabbit by HUEKEL in his Figures 93 and 113, Plate 111.

The other differences regards the staining reactions of the inclusion bodies.

Alastrim bodies do stain regularly a deep blue when they present a small size (Figs. 1, 7, 8 and 12) to grayish-blue when about the same size of the nucleus (Figs. 9 and 20), whereas vaccine bodies present a very capricious staining. Even when they are small and about the size of the nucleolus, vaccine bodies sometimes are definitely pink stained by eosin (Fig. 24), while in most cases their staining is a blue one (Figs. 25, 26 and 28).

The most characteristic feature of vaccine bodies, however, is

the occurrence within the same cell of inclusion bodies stained blue while others show a definite pink staining (Figs. 29-32).

After noticing how numerous were such polychromatophilic inclusion bodies in vaccinia lesions of the monkey, we tried a systematic search for them in alastrim. As a result, the epithelial cell represented in Figure 16 was found in which two crescent-shaped alastrim inclusions are seen, one staining blue, the other pink. Of course this was the only instance in which polychromatophilic alastrim bodies could be demonstrated in the monkey. This is in strong contrast with the marked polychromatophilia remarked in latter stages of vaccine bodies.

SUMMARY

1. — Vesicles and pustules containing numerous cytoplasmic inclusion bodies within the epidermal cells were regularly produced in monkeys (*Macacus rhesus*) by intravenous inoculation either of alastrim virus or of recently prepared vaccine emulsion, no previous scarifications being required. Alastrim virus seems less virulent for this species of monkey than the virus of vaccinia is. While 12 rhesus monkeys injected intravenously with seven strains of alastrim virus developed regularly an experimental infection and finally recovered and remained well, the intravenous injection of vaccine virus was followed by death in two from four rhesus monkeys injected.

2. — Slight but definite and regular differences were noticed between alastrim and vaccine bodies after fixation in Helly's fluid, embedding in paraffin and staining with alum hematoxylin and eosin. They are related to the number of inclusions within the cell and to their staining.

3. — In each cell of the epidermis of *Macacus rhesus* there is usually a single alastrim body when late stages are considered, and quite a few (2-4) when early stages are observed. Alastrim bodies stain a deep blue to grayish-blue. Nevertheless, in necrotic epidermal cells or in cells provided with a few small inclusions they sometimes present a pink staining.

4. — Vaccine bodies in late stages of development are numerous in each epidermal cell of the rhesus monkey and present regularly a characteristic polychromatophilia.

REFERENCES

1. BAUJEAN, R. — Alastrim et variole. Bull. d. l. Soc. Path. Exot., 1923, 16, 676.
2. BLAXALL, F. R. — La variole en Anglaterre pendant l'année 1922

avec quelques notes sur des expériences faites sur ce sujet. Bull. Acad. de Méd., Paris, 1923, 3e. ser., LXXXVIII, 146.

3. GARROW, R. P. — Para-smallpox (synonymous alastrim, amaas), an acute specific infectious disease distinct from smallpox. Lancet, 1925, 208, 5, 225.
4. GOODPASTURE, E. W. — Yellow fever encephalitis of the monkey (*Macacus rhesus*). Am. J. Path., 1932, VIII, 2, 137.
5. GREEN, A. B. — The Australian epidemic. Jour. Hyg., 1915, XVII, 315.
6. HUECKEL, A. — Die Vaccinekörperchen nach Untersuchungen an der geimpften Hornhaut des Kaninchens. Beitr. z. path. Anat. u. allg. Path., 1898, suppl. Heft.
7. JORGE, RICARDO — Alastrim and variola. Lancet, 1924, 1317, 1366.
8. LEAKE, J. P. and FORCE, J. M. — Experiments on alastrim. Public Health Reports, 1921, XXXVI, 1437.
9. LESCHKE, E. — Alastrim, Variola und Pockenschutzimpfung. Münch. Med. Woch., 1929, 76, 2079.
10. MC SWEENEY, P. L. — The clinical and epidemiological characteristics of variola minor and its differencias diagnosis. Quart. J. Med., 1931, 24, 487.
11. TORRES, C. M. et TEIXEIRA, J. C. — Transmission de l'alastrim au Macacus rhesus. C. R. Soc. Biol., 1933, CXII, 917.
12. TORRES, C. M. et TEIXEIRA, J. C. — Histologie de l'alastrim chez le Macacus rhesus. C. R. Soc. Biol., 1933, CXII, 920.
13. TORRES, C. M. et TEIXEIRA, J. C. — Inclusions cytoplasmatiques de l'alastrim chez le Macacus rhesus et chez le Lapin. C. R. Soc. Biol., 1933, CXII, 922.
14. VAN HOOF, L. — Recherches sur l'alastrim au Congo Belge. Ann. Soc. Belge Med. Trop., 1925, 5, 1.

Tip. do Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro — Brasil.